

Aus der Klinik für Neurochirurgie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Entwicklung des perifokalen Hirnödems und Therapie mit dem
selektiven Bradykinin-B₂-Rezeptor-Antagonisten LF 16.0687 Ms.**

Beurteilung anhand magnetresonanztomographischer und gravimetrischer Methoden

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr.med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von
Nils-Kristian Dohse
aus Hamburg

Dekane: Prof. Dr. med. J. W. Dudenhausen
Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. Unterberg
2. Prof. Dr. med. A. v. Deimling
3. Prof. Dr. med. E. Rickels

Datum der Promotion: 26.11.2004

Abstract Deutsch

Das posttraumatische Hirnödem trägt zur erhöhten Morbidität und Mortalität Schädel-Hirn-traumatisierter Patienten bei. Das vasodilatierende Bradykinin führt als ein Bestandteil des Kallikrein-Kinin-Systems über Bradykinin-2 (B2)-Rezeptoren zu einer Öffnung der Blut-Hirn-Schranke und trägt damit zur Entstehung und Aufrechterhaltung des vasogenen bzw. zytotoxischen Hirnödems bei. Eine selektive Hemmung der B2-Rezeptoren konnte bereits die Ausbreitung des posttraumatischen vasogenen Hirnödems erfolgreich vermindern.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Entwicklung des vasogenen Hirnödems, der hemisphäralen Schwellung und der Integrität der Blut-Hirn-Schranke im zeitlichen Verlauf bis 7 Tage nach Controlled Cortical Impact Injury (CCII) an Ratten anhand T2- und T1-gewichteter MRT-Bildgebung charakterisiert. Im zweiten Teil wurde eine mögliche therapeutische Wirkung des spezifischen B2-Antagonisten LF 16.0687 Ms auf das posttraumatische Ödem und der Blut-Hirn-Schrankenöffnung durch Anwendung von MRT- und gravimetrischer Methoden untersucht. In den T2-gewichteten Sequenzen kam es innerhalb von 90 Minuten nach CCII zum prozentual stärksten Anstieg der hemisphäralen Schwellung, ein Maximum lag zwischen 24 und 48 Stunden vor gefolgt von einer Abnahme bis 7 Tage danach. T1-gewichtete Aufnahmen zeigten ein durch die Extravasation von Gadolinium-DTPA erzeugtes Maximum der Kontrastverstärkung innerhalb des Läsionszentrums bereits 6 Stunden nach CCII, während die Kontrastverstärkung in der Ödemperipherie erst nach 48 Stunden Maximalwerte erreichte. Bei einer frühzeitigen Gabe des Kontrastmittels 90 Minuten nach CCII kam es im Verlauf zu einer signifikant höheren Kontrastverstärkung innerhalb der traumatisierten Hemisphäre, vermutlich durch eine Retention des extravasierten Kontrastmittels. Dies könnte für eine frühe Restitution der Blut-Hirn-Schranken Integrität innerhalb der Kontusion sprechen, während der Verschluß perikontusionell erst später erfolgt.

LF 16.0687 Ms führte bei frühzeitiger Gabe nach CCII zu einer signifikanten Reduktion der gravimetrisch bestimmten posttraumatischen hemisphäralen Schwellung um 27%. Hierbei korrelierte die im MRT ermittelte hemisphärale Schwellung signifikant mit den gravimetrisch gemessenen Werten.

Schlagworte:

Bradykinin, Controlled Cortical Impact Injury (CCII), Vasogenes Hirnödem, LF-16.0687 Ms, B2-Rezeptor-Antagonist, MRT, Blut-Hirn-Schranke

Abstract English

Posttraumatic brain edema contributes to a higher morbidity and mortality in severe head-injured patients. Vasodilating bradykinin, part of the kallikrein-kinin-system, mediates over bradykinin 2 (B₂) receptors an blood-brain-barrier (BBB) disfunction and causes the formation and maintenance of vasogenic and cytotoxic brain edema. A selective blocking of the B₂ receptors has been shown to successfully reduce brain edema formation.

One objective of this study was to analyze the development of vasogenic brain edema, lesion-size, hemispheric swelling and BBB-integrity after controlled cortical impact injury (CCII) in rats over a period of 7 days using magnetic resonance imaging (MRI) techniques (T2- and T1-weighted MRI, Gadolinium-DTPA (Gd-DTPA)). The other purpose was to investigate the protective effect of the novel nonpeptide B₂ receptor antagonist LF 16-0687 Ms on posttraumatic edema and BBB-opening using MRI- and gravimetric methods. T2-weighted imaging showed the highest percentual increase of hemispheric swelling during the first 90 minutes after CCII, a maximum between 24 and 48 hours after CCII and a decrease after 7 days. T1-weighted imaging revealed a maximum of contrast enhancement caused by extravasation of Gd-DTPA in the lesion-center 6 hours after CCII, while contrast enhancement in the lesion periphery reached its maximum at 48 hours. After an early administration of Gd-DTPA (90 minutes after CCII) contrast enhancement in the traumatized hemisphere was significantly higher compared to the non-traumatized hemisphere. This could be explained by a retention of Gd-DTPA caused by an early closure of the BBB in the lesion-center, while BBB-integrity in the lesion-periphery re-establishes later. The novel nonpeptide B₂ receptor antagonist LF 16-0687Ms significantly reduced brain swelling by 27% after single administration measured by gravimetric wet-dry-weighting. Gravimetric and T2-weighted MRI-measurements of hemispheric swelling correlated significantly.

Keywords:

Bradykinin, controlled cortical impact injury (CCII), vasogenic brain edema, LF16-0687 Ms, B₂ receptor antagonist, MRI, blood-brain-barrier

Dekane: Prof. Dr. med. J. W. Dudenhausen
Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. Unterberg
2. Prof. Dr. med. A. v. Deimling
3. Prof. Dr. med. E. Rickels

Datum der Promotion: 26.11.2004

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Definition und klinische Bedeutung des perifokalen Hirnödems.....	1
1.2 Pathophysiologische und morphologische Einteilung des Hirnödems nach Trauma.....	2
1.3 Mediatoren des posttraumatischen Hirnödems.....	3
1.4 Therapie des posttraumatischen Hirnödems und des erhöhten intrakraniellen Drucks..	3
1.5 Bradykinin, Bradykininrezeptorantagonisten und das vasogene Hirnödem.....	4
1.6 Diagnostik des posttraumatischen perifokalen Hirnödems	5
2. Zielsetzung der Arbeit.....	6
3. Material und Methodik.....	7
3.1 Versuchstiere und Versuchsgruppen	7
3.2 Versuchsdurchführung.....	9
3.2.1 Narkose.....	9
3.2.2 Kraniektomie	9
3.2.3 Die Controlled Cortical Impact Injury (CCII) -Trauma-Einheit	11
3.2.4 Magnetresonanztomographische (MRT) -Anlage und Software.....	13
3.2.5 MRT-Messreihe.....	13
3.2.6 Die T2- und T1-gewichteten Sequenzen	14
3.2.7 Verabreichung des Bradykinin-B ₂ -Rezeptorantagonisten LF 16.0687 Ms	17
3.2.8 Überwachung des mittleren arteriellen Blutdruckes (MABP)	17
3.2.9 Blutentnahmen.....	18
3.2.10 ICP-Messung	18
3.2.11 Entblutung des Tieres und Hirnentnahme	19
3.3 Auswertungsmethoden	20
3.3.1 Auswertung der MRT-Bilddaten.....	20
3.3.1.1 Bestimmung des Ödemvolumens.....	20
3.3.1.2 Bestimmung des relativen Anteils des Ödemareales an der Hemisphäre	21
3.3.1.3 Bestimmung der hemisphäralen Schwellung	22
3.3.1.4 Bestimmung der Kontrastmittelextravasation.....	23
3.3.2 Gravimetrische Bestimmung der posttraumatischen Hemisphärenschwellung ...	26
3.3.2.1 Zerebraler Wassergehalt.....	26

3.3.2.2	Bestimmung des Trennfehlers.....	27
3.3.3	Statistische Auswertung	27
4.	Ergebnisse	28
4.1	Dynamik der posttraumatischen perifokalen Hirnödemen-Entwicklung nach CCII	28
4.1.1	T2-gewichtete Bildgebung	28
4.1.2	T1-gewichtete Aufnahmen mit Kontrastmittelapplikation.....	29
4.1.2.1	Grad der Kontrastverstärkung	29
4.1.2.2	Ausdehnung der Kontrastmittel-Extravasation	32
4.2	Therapie des posttraumatischen Hirnödems mit LF 16.0687 Ms.....	34
4.2.1	Gravimetrische Bestimmung der hemisphäralen Schwellung.....	34
4.2.2	Zerebraler Wassergehalt	34
4.2.3	Physiologische Parameter.....	36
4.2.3.1	Mittlerer Arterieller Blutdruck (MABP)	36
4.2.3.2	Intrakranieller Druck (ICP) und Zerebraler Perfusionsdruck (CPP).....	36
4.2.3.3	Ergebnisse der arteriellen Blutgasanalyse.....	37
4.2.3.4	Posttraumatische Gewichtsentwicklung.....	37
4.3	Magnetresonanztomographische Quantifizierung der Wirkung von LF 16.0687 Ms ..	38
4.3.1	T2-gewichtete Aufnahmen	38
4.3.2	T1-gewichtete Aufnahmen mit Kontrastmittelapplikation.....	39
4.3.2.1	Grad der Kontrastverstärkung	39
4.3.2.2	Fläche der Kontrastmittelextravasation.....	40
4.3.3	Gravimetrische Bestimmung der hemisphäralen Schwellung.....	41
4.3.4	Korrelation zwischen Magnetresonanztomographie und Gravimetrie	42
4.3.5	Gravimetrische Bestimmung des zerebralen Wassergehaltes	43
4.3.6	Posttraumatische Gewichtsabnahme	44
5.	Diskussion.....	45
5.1	Anmerkungen zu Material und Methodik.....	45
5.1.1	Wahl des experimentellen kortikalen Kontusionsmodells	45
5.1.2	Wahl der Versuchstiere	46
5.1.3	Effekt von osteoplastischer Trepanation und Inhalationsnarkose	47
5.2	Entwicklung des posttraumatischen Hirnödems.....	48
5.2.1	Wachstumsdynamik im zeitlichen Verlauf.....	48

5.2.2	Rückbildung des perifokalen Hirnödems	50
5.2.3	Dynamik des Blut-Hirn-Schranken-Schadens und der zerebralen Durchblutung	50
5.3	Das Mediatorenkonzept des posttraumatischen (vasogenen) Hirnödems	54
5.4	Das Kallikrein-Kinin-System im zentralen Nervensystem.....	55
5.4.1	Grundlagen des Kallikrein – Kinin Systems	55
5.4.2	Wirkungen der Kinine auf das zentrale Nervensystem	58
5.4.3	Kinin-Rezeptoren: Signaltransduktion und Lokalisation im Zentralen Nervensystem.....	61
5.4.4	Wirkungen von Bradykinin auf Vasomotorik und die Blut-Hirn-Schranke.....	62
5.4.5	Kininantagonistische Substanzen und Kinin-Rezeptor-Antagonisten.....	64
5.5	Der spezifische Bradykinin-B ₂ -Rezeptorantagonist LF 16.0687 Ms	64
5.5.1	Chemische Struktur, Pharmakodynamik und -kinetik.....	64
5.5.2	Andere tierexperimentelle Untersuchungen an Trauma-Modellen	66
5.5.3	Interpretation der Therapiestudien mit LF 16.0687 Ms	67
5.6	Vergleich der Quantifizierungsmöglichkeiten des posttraumatischen Hirnödems mittels MRT und Gravimetrie.....	68
6.	Zusammenfassung und Ausblick	69
7.	Literaturverzeichnis	71
	Danksagung.....	83

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1: MRT-Meßzeitpunkte der hemisphäralen Schwellung über 7 Tage.....	8
Abb. 3.2: Darstellung der Kraniektomie [modifiziert nach: (Pellegrino et al., 1979)]	11
Abb. 3.3: Schemazeichnung der Bolzen-Positionierung	12
Abb. 3.4: Transversale Scout-Aufnahmen zur Schichtpositionierung	15
Abb. 3.5: Bestimmung des Ödemareals in der T2-gewichteten Bildgebung (Schicht 5).....	21
Abb. 3.6: Bestimmung des Volumens der traumatisierten Hemisphäre (Schicht 5).....	21
Abb. 3.7: Bestimmung des Gesamthirn-Volumens (Schicht 5)	22
Abb. 3.8: Anflutung des Kontrastmittels in der T1-gewichteten Bildgebung 24 h nach CCII	23
Abb. 3.9: Markierung der traumatisierten Hemisphäre in den T1-gewichteten Bildern.....	24
Abb. 3.10: Spezifische Stoßrichtungs-Messpunkte in der traumatisierten und nicht- traumatisierten Hemisphäre (Schicht 5)	25
Abb. 3.11: Spezifische Kortex-Messpunkte in der traumatisierten und nicht- traumatisierten Hemisphäre (Schicht 5)	25
Abb. 4.1: Volumendifferenz zwischen traumatisierter und nicht-traumatisierter Hemisphäre (in Prozent der nicht-traumatisierten Hemisphäre)	28
Abb. 4.2: Relativer Anteil des Kontusions- / Ödemvolumens am Volumen der traumatisierten Hemisphäre.....	29
Abb. 4.3: Grad der Kontrastverstärkung 20 Minuten nach Kontrastmittelapplikation	30
Abb. 4.4: Grad der Kontrastverstärkung des Läsionszentrums in den Schichten 3-7	31
Abb. 4.5: Grad der Kontrastverstärkung des Läsionszentrums im Vergleich mit in Stoßrichtung gelegenen Meßpunkten (Schicht 5)	31
Abb. 4.6: Grad der Kontrastverstärkung des Läsionszentrums im Vergleich mit kortikal gelegenen Meßpunkte (Schicht 5)	32
Abb. 4.7: Fläche der Kontrastmittelextravasation in den Schichten 3-7 jeweils 20 Minuten nach KM-Applikation zu den verschiedenen Meßzeitpunkten nach CCII.....	33
Abb. 4.8: Hemisphärale Schwellung nach Gabe von LF 16.0687 Ms	34
Abb. 4.9: Wassergehalt der traumatisierten und nicht-traumatisierten Hemisphäre.....	35
Abb. 4.10: Interhemisphärale Differenz des Wassergehaltes	35

Abb. 4.11: Volumendifferenz zwischen traumatisierter und nicht-traumatisierter Hemisphäre (in Prozent der nicht-traumatisierten Hemisphäre) in T2-Bildgebung.....	38
Abb. 4.12: Grad der Kontrastverstärkung in der Kontusion mit und ohne frühe KM-Applikation (90 min nach CCII).....	39
Abb. 4.13: Grad der Kontrastverstärkung zwischen traumatisierter und nicht-traumatisierter Hemisphäre 20 Minuten nach Kontrastmittelapplikation.....	40
Abb. 4.14: Fläche der Kontrastmittelextravasation 5 Minuten nach KM-Applikation (NaCl und LF 16.0687 Ms im Vergleich)	41
Abb. 4.15: Hemisphärale Schwellung nach NaCl und LF 16.0687 Ms-Gabe der gravimetrisch und zusätzlich magnetresonanztomographisch untersuchten Tiere.....	42
Abb. 4.16: Regression zwischen gravimetrisch und magnetresonanztomographisch bestimmter hemisphäraler Schwellung.....	42
Abb. 4.17: Wassergehalt der traumatisierten und nicht-traumatisierten Hemisphäre nach NaCl und Substanzgabe (MRT-Tiere vs. Nicht-MRT-Tiere).....	43
Abb. 4.18: Interhemisphärale Differenz des Wassergehaltes (MRT-Tiere vs. Nicht-MRT-Tiere)	44
Abb. 5.1: Enzymatisch bedingte Formation der verschiedenen Kinine	56
Abb. 5.2: Bildung von Bradykinin im Gewebe und Plasma	57
Abb. 5.3: Zusammenfassung der Kinin-Effekte auf das ZNS	62
Abb. 5.4: Bradykinin B ₂ - und B ₁ -Rezeptoren	59
Abb. 5.5: B ₂ -Rezeptoren gekoppelte Mechanismen.....	60
Abb. 5.6: Chemische Strukturformel von LF 16.0687	65

Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1: PARAVISION-Parameter der T2-gewichteten Sequenz.....	15
Tab. 3.2: PARAVISION-Parameter der T1-gewichteten Sequenz.....	16
Tab. 4.1: Mittlerer arterieller Blutdruck	36
Tab. 4.2: ICP und CPP	36
Tab. 4.3: Blutgase der Kontrollgruppe	37
Tab. 4.4: Blutgase (Dosis : 3mg/kg KG)	37
Tab. 4.5: Blutgase (Dosis : 30mg/kg KG)	37

1. Einleitung

Trotz verbesserter diagnostischer und therapeutischer Maßnahmen stellt das schwere Schädel-Hirn-Trauma (SHT) eine der häufigsten Todes- und Behinderungsursachen junger Erwachsener dar. In Deutschland erleiden jährlich ca. 30.000 Menschen ein SHT, von denen bis zu 50 % innerhalb der ersten Tage an den Folgen dieser Verletzung sterben (Baethmann et al., 1998).

Die Entwicklung der intrazerebralen Schädigung ist in der Frühphase am ehesten günstig zu beeinflussen [zur Übersicht: (Baethmann et al., 1998)](Stover et al., 2000a; Stover et al., 2001). Folglich sollte eine spezifische therapeutische Intervention zur Behandlung schwerer Schädel-Hirn-Traumata so bald als möglich beginnen. Bis heute existiert jedoch noch keine anerkannte spezifische Therapie. Dies und die ernste Prognose dieses Krankheitsbildes begründen die intensive Erforschung verschiedener pharmakologischer Ansatzpunkte.

1.1 Definition und klinische Bedeutung des perifokalen Hirnödems

Die neuropathologische Klassifikation unterscheidet zwei zerebrale Schädigungen nach einem SHT:

Der entstandene **Primärschaden** kann sich als Kontusion oder Laceration, diffuser Axonschaden oder intrakranielle Blutung äußern.

Das Ausmaß des sich im weiteren entwickelnden Hirnparenchymschadens hängt zum Teil von dieser primären (mechanischen) Verletzung ab und kann sekundär durch das entstehende **Hirnödem** als Ausdruck einer fortschreitenden funktionellen und strukturellen Zellschädigung weiter verschlimmert werden.

Charakteristisch für dieses Hirnödem ist die Wasseransammlung in den zerebralen Intra- und Extrazellulärräumen. Sie führt zwangsläufig zu einem Anstieg des intrakraniellen Volumens und somit auch des intrakraniellen Druckes (ICP). Diese ICP-Erhöhung kann wiederum zu einer lebensbedrohlichen Einklemmung, zu ausgedehnten Infarkten und zu Mittel- oder Stammhirneinblutungen führen.

Die intrakranielle Druckzunahme ist oft mit einer Aufhebung der zerebralen Autoregulation und verminderter zerebraler Perfusion verbunden. Unterschreitet die zerebrale Perfusion schließlich die Ischämiegrenze, resultiert eine Gewebeazidose und ein ischämisches

Hirnödem, das zu einer Zunahme des bestehenden Hirnödems führt und die zerebrale Homöostase weiter beeinträchtigt.

Folglich stellt das Hirnödem neben Hypoxie und Hypotension einen entscheidenden Faktor dar, der die neurologische Entwicklung der Patienten maßgeblich beeinflusst (Chesnut et al., 1993).

Eine Reduktion oder im Idealfall eine Verhinderung der Ödemenstehung und –progression durch frühzeitige therapeutische Maßnahmen wäre wünschenswert und ist das Ziel aktueller pharmakologischer Untersuchungen.

1.2 Pathophysiologische und morphologische Einteilung des Hirnödems nach Trauma

Das posttraumatisch entstehende Hirnödem kann pathophysiologisch (Klatzo et al., 1987) und biomechanisch in mindestens zwei, wenn nicht sogar drei Typen (Barzó et al., 1997a) unterteilt werden (Klatzo, 1967; Kuroiwa et al., 1994; Marmarou, 1994):

Das **zytotoxische**, **vasogene** und das **ischämische** Hirnödem. Diese drei Formen bestehen in unterschiedlicher Ausprägung klinisch gleichzeitig und bedingen z.T. einander.

Das **zytotoxische Hirnödem** wird primär durch eine Störung des Elektrolytgleichgewichtes hervorgerufen, bei der extrazelluläres Na^+ , Cl^- und Wasser nach intrazellulär strömt, bedingt durch die Störung des Zellmetabolismus und der damit einhergehenden Dysfunktion der in der glialen, neuronalen und endothelialen Membran lokalisierten Na^+/K^+ -ATPase. Diese Funktionsstörung tritt in unterschiedlicher Ausprägung und Geschwindigkeit auf, in Abhängigkeit von der Schwere des Primärschadens und der Begleitumstände (Hypoxie, Schockzustand, Hypoglykämie, etc.). Sie führt neben einer vermehrten intrazellulären Na^+ - und Wasserretention zu einer extrazellulären Akkumulation von Kalium (Takahashi et al., 1981; Katayama et al., 1990). Zudem werden exzitatorische Aminosäuren ausgeschüttet, die ihrerseits eine Zellschwellung herbeiführen (Bhoola et al., 1987). Ferner kommt es zu einem Abfall der Gewebs- O_2 -Konzentration und des pH (Kempinski, 2001). Die Blut-Hirnschranke ist beim reinen zytotoxischen Hirnödem primär intakt (Klatzo et al., 1987).

Das **vasogene Hirnödem** beruht hauptsächlich auf einer Schädigung der zerebralen Kapillargefäße (Blut-Hirn-Schranke) durch Gewebeverletzung bei der Kontusion und bei persistierender Ischämie. Morphologisch ist dies mit einer Aufweitung der interendothelialen „tight junctions“ der kapillaren Endothelzellen vergesellschaftet. Durch den bestehenden

hydrostatischen Druck und dem daraus resultierenden Druckgradienten kommt es hier zu einem Übertritt eines proteinreichen, plasmaähnlichen Filtrates in den zerebralen Extrazellulärraum. Die Proteine werden dabei verstärkt durch Glia und Neurone aufgenommen, was durch gleichzeitige Wasserbindung zu einer Zellschwellung führt. Somit trägt das vasogene Hirnödem sekundär zu einer intrazellulären Wasseransammlung bei (Klatzo et al., 1987).

1.3 Mediatoren des posttraumatischen Hirnödems

Mediatoren, die aus der fokalen Kontusionsnekrose bzw. mit dem plasmaähnlichen Filtrat der Ödemflüssigkeit freigesetzt, gebildet oder aktiviert werden, lassen die vasogene und zytotoxische Komponente des Hirnödems entstehen, halten diese aufrecht und verstärken sie. Untermauert wurde dies durch die Tatsache, daß eine chirurgische Entfernung der Nekrose eine weitere Ödemformation im Cold-Lesion-Modell (s.u.) verminderte (Aarabi et al., 1979).

In den letzten 20 Jahren wurden viele im ZNS vorkommende Substanzen auf ihre eventuelle Mediatorfunktion hinsichtlich der Entstehung und Verstärkung des sekundären Hirnschadens untersucht. Neben Substanzen wie Histamin und freie Fettsäuren, wie z.B. die Arachidonsäure, konnte insbesondere für die Bestandteile des Kallikrein-Kinin-Systems (z.B. Bradykinin) eine Mediatorfunktion bezüglich des vasogenen Hirnödems nachgewiesen werden (Baethmann et al., 1983; Maier-Hauff et al., 1984; Unterberg et al., 1984a; Unterberg et al., 1987; Kamiya et al., 1993) [zur Übersicht: (Schilling et al., 1999)].

1.4 Therapie des posttraumatischen Hirnödems und des erhöhten intrakraniellen Drucks

Da der Primärschaden an sich irreversibel und einer Therapie nicht zugänglich ist, ist das sich sekundär entwickelnde Hirnödem von höchstem klinischen Interesse und steht deshalb im Mittelpunkt intensiver klinischer und präklinischer Forschung.

Die Therapie eines erhöhten intrakraniellen Druckes durch mäßige Oberkörperhochlagerung, moderate Hyperventilation, Hypothermie, hyperosmolare Lösungen, Vasopressoren zur Anhebung des CPP, Schleifendiuretika- oder Barbiturat-Therapie ist rein symptomatischer Natur. Sie besteht neben den operativen Maßnahmen wie der ventrikulären Drainage, Dekompressionstrepanation oder der Hämatomausräumung im

wesentlichen seit Jahrzehnten unverändert [zur Übersicht: Guidelines for the management of severe TBI (Bullock et al., 1996; Povlishock JT, 2000)].

Wie zahlreiche experimentelle Untersuchungen belegen, kann eine effektive Antagonisierung eines oder mehrerer Mediatoren zu einer drastischen Verringerung des vasogenen Hirnödems führen. Bisher wurden vor allem anticholinerge (akute posttraumatische Phase), cholinomimetische (späte posttraumatische Phase), antihistaminerge und antiinflammatorische Therapieansätze untersucht (Schilling et al., 1994). In jüngster Zeit wurden zudem auch Versuche mit neuronalen Wachstumsfaktoren, Kalzium-Kanal-Blockern, Calpain-Antagonisten, Radikal-Fängern, Lipid-Peroxydation-Inhibitoren sowie Glutamat-Antagonisten unternommen [zur Übersicht: (McIntosh et al., 1998)]. Leider konnte sich in der Mehrzahl der Fälle der experimentell erzielte Erfolg im Rahmen klinisch kontrollierter Studien nicht wiederholen lassen [zur Übersicht: (McIntosh et al., 1998)]. Dies hängt u.a. damit zusammen, daß das menschliche Schädel-Hirn-Trauma im Vergleich zu den standardisierten experimentellen Traumamodellen ein sehr inhomogenes Krankheitsbild darstellt.

Während die Mehrzahl der über die letzten Jahre hinweg verwendeten neuroprotektiven Pharmaka eine Beeinflussung bzw. Reduktion des Zellschadens und des zytotoxischen Hirnödems zum Ziel hatten, existieren nur wenige Studien zur Begrenzung des vasogenen Hirnödems, abgesehen von alten tierexperimentellen Studien mit Kortikoiden (Unterberg et al., 1990).

1.5 Bradykinin, Bradykininrezeptorantagonisten und das vasogene Hirnödem

Bradykinin ist ein wichtiger Mediator der peripheren Entzündungskaskade und einer der wichtigsten Mediatoren im Rahmen der Entstehung und Aufrechterhaltung des vasogenen bzw. zytotoxischen Hirnödems (Regoli et al., 1980; Kamiya et al., 1993). Alle Bestandteile des Kallikrein-Kinin-Systems wurden im zentralen Nervensystem nachgewiesen.

Durch die auf der abluminalen Membran der Endothelzellen lokalisierten B₂-Rezeptoren vermittelt, bewirkt Bradykinin eine Dilatation der Arteriolen und Konstriktion der Venolen, was zu einer Erhöhung des Kapillardruckes und Steigerung der vaskulären Permeabilität führt. Dieses unterstützt nach Entstehung eines Blut-Hirn-Schranken-Schadens die weitere Ausbreitung des perifokalen vasogenen Hirnödemes (Bhoola et al., 1992). Der positive Effekt einer unspezifischen, aber auch gezielten Antagonisierung dieser Bradykinin-vermittelten

Wirkung mittels Rezeptorantagonisten wurde bereits in einigen Studien gezeigt (Kamiya et al., 1993):

Unterberg wies anhand des Einsatzes von Aprotinin, einem polyvalenten Proteaseinhibitor, der vornehmlich gewebständiges Kallikrein inhibiert, eine um 22,3% geringere Ausbildung des posttraumatischen Hirnödems im Cold-Lesion-Modell nach (Marmarou et al., 1999; Unterberg et al., 1986).

In einer experimentellen Studie reduzierte der Bradykinin-Rezeptorantagonist CP-0597 die ischämie-bedingte hemisphärele Schwellung gegenüber der Kontrollgruppe um ca. 20% (Relton et al., 1997).

Ein weiterer - CP-1027 - verbesserte in einer klinischen Studie den posttraumatischen ICP, den GOS (Glasgow Outcome Score) und das neuropsychologische Outcome 6 Monate nach Trauma signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (Marmarou et al., 1999).

Die Antagonisierung der Bradykininrezeptoren zur Eindämmung des posttraumatischen Hirnödems stellt somit einen erfolgsversprechenden Ansatz in der Therapie Schädel-Hirn-traumatisierter Patienten dar.

1.6 Diagnostik des posttraumatischen perifokalen Hirnödems

Die Diagnostik des posttraumatischen Hirnödems erfolgt in der klinischen Routine mittels Computertomographie. Magnetresonanztomographische Verfahren sind aufgrund des relativ hohen apparativen und zeitlichen Aufwandes der Untersuchungen als primär eingesetztes bildgebendes Diagnostikum eines kreislaufinstabilen, traumatisierten Patienten nicht gut geeignet.

Beim kreislaufstabilen Patienten bietet die Magnetresonanztomographie jedoch die Möglichkeit, T1- (mit Kontrastmittelapplikation), T2-gewichteten Aufnahmen, perfusions-gewichtete und angiographische Bildtechniken zu realisieren. Diese verschiedenen Techniken erlauben - neben einer detaillierteren Beurteilung des Primärschadens und der Ausbreitung des perifokalen Hirnödems - auch die Beurteilung des Blut-Hirn-Schranke-Status in verschiedenen Hirnarealen.

2. Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum einen die Dynamik des Hirnödems nach Controlled Cortical Impact Injury (CCII) im zeitlichen Verlauf charakterisiert und zum anderen, die therapeutische Beeinflußbarkeit des posttraumatischen Hirnödems durch selektive Hemmung von B₂-Rezeptoren untersucht. Diese Veränderungen wurden mittels gravimetrischer und magnetresonanztomographischer Methoden beurteilt.

Dazu sollte:

1. Anhand T2-gewichteter MRT-Bilder ein Profil der hemisphäralen Schwellung erstellt und in T1-gewichteter Bildgebung (nativ und nach Kontrastmittelgabe zu verschiedenen Zeitpunkten) die Dynamik der Blut-Hirn-Schranken-Störung genauer betrachtet werden, und
2. geklärt werden, ob die selektive Hemmung von zerebralen Bradykinin-B₂-Rezeptoren mit dem selektiven, kompetitiven B₂-Rezeptorantagonisten LF 16.0687 Ms das Ausmaß des perifokalen posttraumatischen Hirnödems dosisabhängig verringert.

Dabei konnte überprüft werden, inwieweit die Gravimetrie zur Quantifizierung des posttraumatischen perifokalen Hirnödems nach einer im tierexperimentellen Modell induzierten kortikalen Kontusion mit den anhand von T2-gewichteten MRT-Bildern gewonnenen Daten korrelieren.

3. Material und Methodik

Die im folgenden dargestellte mikrochirurgische Präparation und die Erzeugung der fokalen kortikalen Kontusion anhand des Cortical Impact Injury Traumamodells (CCII) wurde im Labor für Experimentelle Neurochirurgie (unter der Leitung von Professor Dr. Unterberg) an der Charité (Campus Virchow, Humboldt Universität zu Berlin) durchgeführt. Die magnetresonanztomographischen Untersuchungen erfolgten in der Abteilung für Kernspintomographie des Institutes für radiologische Diagnostik (unter der Leitung von Professor Dr. Wolf) des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin.

3.1 Versuchstiere und Versuchsgruppen

Die Versuche wurden im Rahmen des von der Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales des Landes Berlin genehmigten Tierversuchsvorhabens G 0150/98 durchgeführt.

Als Versuchstiere wurden ausschließlich männliche Sprague-Dawley-Ratten (Charles River, Deutschland) verwendet. Die Ratten hatten vor CCII ein durchschnittliches Körpergewicht von 328 ± 8 g und wurden 24 Stunden vor Studienbeginn an die Laborumgebung gewöhnt. Die Tiere wurden in natürlichem Tages- und Nachtrhythmus in Makrolonkäfigen zu jeweils 5 Tieren gehalten, die mit Holzspäne (Fa. Altromin, Deutschland) gefüllt waren und hatten in den Käfigen freien Zugang zu Futter (Altromin[®], Fa. Altromin, Deutschland) und Wasser.

Die Zuordnung der Tiere zur Kontrollgruppe bzw. zu den Therapiegruppen erfolgte randomisiert. Bei allen Versuchsgruppen wurde dafür Sorge getragen, daß das Verhältnis zwischen Kontrollgruppe und der Therapiegruppen pro Versuchstag ausgeglichen war. Insgesamt wurden 79 Ratten untersucht.

Die longitudinale Charakterisierung der postraumatischen Ödementwicklung bis 7 Tage nach Trauma durch bildgebende MRT-Methoden erfolgte anhand von 9 nicht-therapierten Tieren. Das dynamische Profil wurde durch Messungen zu den folgenden Zeitpunkte erstellt (s. Abb. 3.1):

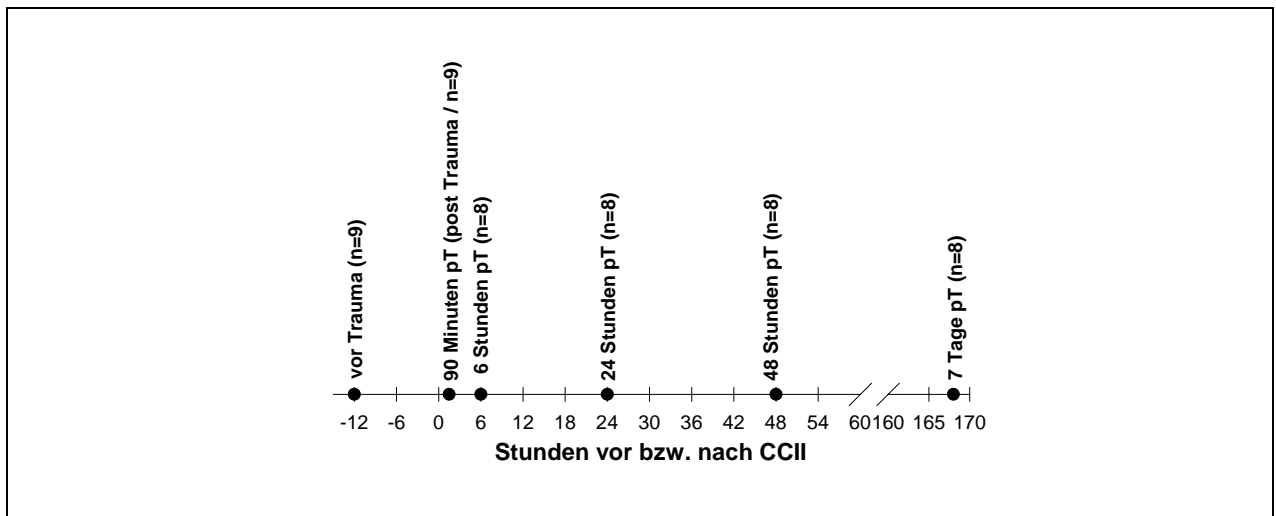


Abb. 3.1: MRT-Meßzeitpunkte der hemisphären Schwellung über 7 Tage

Für die Untersuchung der antiödematösen Wirkung des spezifischen Bradykinin-B₂-Rezeptorantagonisten LF 16.0687 Ms (Laboratoires Fournier, Daix, Frankreich) wurden insgesamt 60 Tiere verwendet, von denen 21 als Kontrolltiere 1 ml physiologische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) durch subkutane Injektion erhielten.

Der Bradykinin-B₂-Rezeptorantagonist LF 16.0687 Ms wurde in zwei Dosierungen verabreicht: 3 mg/kg KG (n=22) und 30 mg/kg KG (n=17).

Alle Tiere wurden nach dem gleichen Schema traumatisiert, therapiert und getötet. 24 Stunden nach CCII wurde in allen Tieren der Schwellungswert, der Wassergehalt und der Trennfehler gravimetrisch bestimmt.

In einer weiterführenden Untersuchung erhielten jeweils 5 Tiere NaCl oder den Bradykinin-B₂-Rezeptorantagonisten LF 16.0687 Ms (3 mg/kg KG), um magnetresonanztomographisch die protektive Wirkung dieses Antagonisten anhand der Veränderungen der hemisphären Schwellung und der Bluthirnschrankenstörung zu den Zeitpunkten 6 und 24 Stunden nach Trauma zu bestimmen. Nach der letzten MRT-Messung wurden die Hirne zur gravimetrischen Bestimmung des Hirnödems entnommen, was einen direkten Vergleich der magnetresonanztomographischen und der gravimetrischen Bestimmung des Hirnödems zuließ.

3.2 Versuchsdurchführung

3.2.1 Narkose

Alle im folgenden beschriebenen, an den Tieren durchgeführte Eingriffe (Kraniektomie, Traumatisierung, Blutabnahme, Entblutung, Hirnentnahme) und MRT-Messungen wurden am narkotisierten Tier vorgenommen. Die Narkosegas-einheiten und Maskenvorrichtungen waren sowohl im mikrochirurgischen Labor als auch im MRT-Raum in gleicher Ausführung vorhanden.

Zur Einleitung der Narkose wurden die Tiere in einem luftdicht abschließenden Narkose-Topf, der über eine Narkosegas-Zufuhr und -Absaugung verfügte, über 3 Minuten narkotisiert. Das hierzu verwendete Gas-Gemisch setzte sich aus Isofluran (5 Vol.%, Forene[®], Abbott GmbH) sowie N₂O (1 l/min) und O₂ (0,5 l/min) zusammen und stammte aus einer Narkosegas-Verdampfer-Einheit (Sulla 808, Fa. Dräger Werk AG, Lübeck).

Danach wurde die Narkose mit einer doppelumigen Narkose-Maske fortgeführt, deren inneres Lumen über eine Narkosegas-Zuführung und deren äußeres Lumen über die Narkosegas-Absaugung verfügte. Das Narkosegas-Gemisch konnte zur Aufrechterhaltung der Narkose während der Kraniektomie bzw. der Traumatisierung, der Entblutung und während der MRT-Messungen vermindert werden (N₂O 0,5 l/min, O₂ 0,3 l/min, Isofluran von 2,0 Vol. %). Die spontan atmenden Tiere waren so vollständig narkotisiert, relaxiert und analgesiert.

Um ein Austrocknen der Kornea der geöffneten Augen zu verhindern, wurde Panthenol-Augensalbe (Dexapanthenol, Jenapharm, Deutschland) verwendet.

Zur Ausleitung der Narkose wurden die Tiere bis zum völligen Erwachen mit 0,8 l/min O₂ (100 %) nachventiliert, um die durch die rasche Rückflutung des N₂O entstehende Diffusionshypoxie zu minimieren.

3.2.2 Kraniektomie

Die Tiere wurden möglichst reizarm von den Tierstallungen in das Versuchslaboratorium gebracht und dort zu jeweils fünf Ratten pro Käfig gehalten. Nach der Narkoseeinleitung wurde das Gewicht der Tiere protokolliert. Die rektal gemessene Temperatur wurde mittels einer selbstregulierenden Heizmatte (Temperature Control Unit HB 101/2, Fa. Letica Scientific Instruments, Spanien) während der Kraniektomie, der Traumatisierung sowie vor

der abschließenden Entnahme des Gehirnes zwischen 37 °C und 38 °C konstant gehalten und im 10 Minuten-Abstand protokolliert.

Zur Kraniektomie wurden die Tiere in einem stereotaktischen Rahmen (stereotaktische Sockeleinheit, Fa. David Kopf Instruments, Tujunga, California / USA) fixiert. Nach Rasur des oberen Kopfes erfolgte eine Hautinzision in der Mittellinie von einer die Augen verbindenden, ca. 3 cm messenden Linie bis in den Nacken und die Mobilisierung der Haut über der linken Seite der Kalotte bis zum Arcus zygomaticus. Die entstandene Wunde wurde durch Anzügelung der Hautlappen mittels Standard-Nahtmaterial gespreizt. Zur Freilegung des Operationsfeldes wurden die Sutura coronalis, Sutura sagittalis sowie die Sutura lambdalis dargestellt, der linke M. temporalis mit einer Bipolar-Pinzette vom Ursprung gelöst und bis zum Arcus zygomaticus abgesetzt. Darauf wurde die Kraniektomie mittels eines stufenlos regelbaren Bohrers (Bohr- und Fräsgerät: Minimot 40 E) mit Diamantbohrkopf (Kugelbohrkopf $\varnothing = 1,8$ mm, Fa. Proxxon, Deutschland) bei ca. 2000 U/min möglichst erschütterungsarm vorgenommen. Dabei wurde sowohl zur Lambda-Naht als auch zur Sagittal-Naht ein Sicherheitsabstand gehalten, um die darunter gelegenen venösen Sinus zu schonen, während direkt auf der Koronar-Naht gefräst werden konnte. Die untere Fräslinie wurde zwischen mittlerem und unterem Drittel der Strecke zwischen der Knochenleiste des M. temporalis und dem Arcus zygomaticus angesetzt (s. Abb.3.2). Bei der Fräsung durch den Knochen wie auch bei der Entnahme des rechteckigen Knochendeckels (ca. 7 mm x 5 mm) wurde dafür Sorge getragen, daß die Dura mater intakt blieb und eine zusätzliche Schädigung vermieden wurde. Die erstellte Kraniektomie maß ca. 7 mm x 10 mm. Das Arbeitsfeld wurde während der Kraniektomie permanent mit isotoner NaCl-Lösung (0,9 %) gespült, was sowohl der Kühlung des Bohrkopfes als auch der Entfernung der entstehenden Knochenspäne diente. Die Spülflüssigkeit wurde kontinuierlich abgesaugt.

Nach erfolgreicher Kraniektomie und Entnahme des Knochendeckels wurde die intakte Dura mit einem NaCl-getränkten Tupfer bedeckt, die Narkose fortgeführt und das Tier während der Umlagerung auf die Trauma-Einheit auf der Wärmematte belassen.

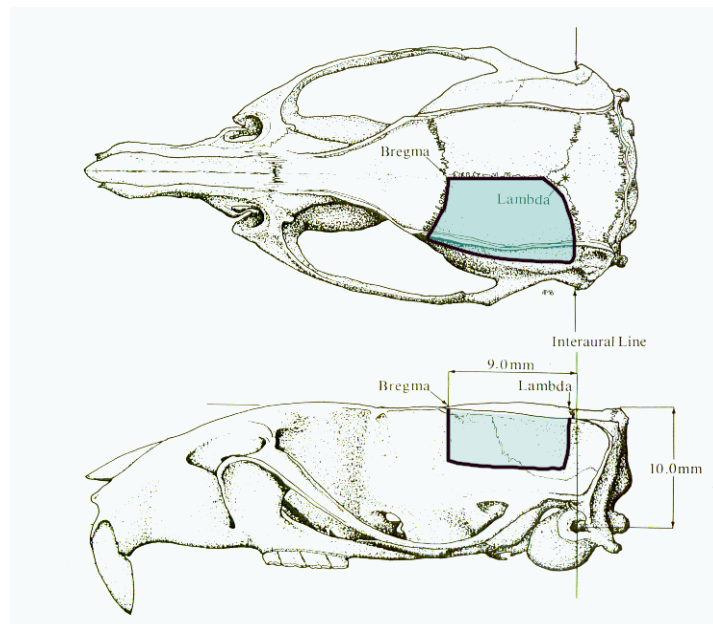


Abb. 3.2: Darstellung der Kraniektomie [modifiziert nach: (Pellegrino et al., 1979)]

3.2.3 Die Controlled Cortical Impact Injury (CCII) -Trauma-Einheit

Unter Verwendung des Controlled Cortical Impact Injury-Gerätes wurde eine fokale kortikale Kontusion erzeugt.

Hierbei übte ein auf der Kolbenstange eines pneumatisch, in beide Richtungen kontrolliert bewegbaren Zylinders und über ein tiefenverstellbares Gewinde befestigter Bolzen den Kontusionsstoß aus. Sowohl für die Hinbewegung als auch für die Rückholung wurde der Kolben innerhalb des Zylinders über ein separates, durch einen regelbaren N₂-Druckluftanschluß gespeistes Modul beschleunigt. Die zwischen diesen beiden Bewegungen liegende Kontaktzeit ließ sich über einen Verzögerungsregler variieren.

Die Fixierung des Tieres in der CCII-Trauma-Einheit erfolgte in einer stereotaktischen Vorrichtung, die auf einem in der Einheit verschieblichen Schlitten montiert war. Der Schlitten bot die Möglichkeit der optimalen Ausrichtung des Kraniektomieareales in allen drei Ebenen des Raumes in bezug zum Bolzen. Auf diese Weise konnte der Schlitten so zum Bolzen ausgerichtet werden, daß dieser immer in demselben Winkel in der horizontalen (0°) und vertikalen Ebene (30°) auf die Konvexität des Gehirns traf.

Der maximal ausgefahrene Bolzen konnte über ein Gewinde so eingestellt werden, daß er gerade die Dura mater berührte. Dann wurde er zurückgefahren und die Impressionstiefe des Bolzens um 2 mm vergrößert, wobei eine Umdrehung des Bolzens einer Eindringtiefe von 1 mm entsprach. Die Sicherung des Bolzens auf dem Gewinde erfolgte über eine Kontermutter.

Der an der Spitze abgerundete Bolzen hatte zwar einen absoluten Durchmesser von 8 mm, da die Eindringtiefe von 2 mm allerdings die Länge der abgerundeten Spitze (3 mm) unterschritt, drang dieser nur mit einem maximalen Durchmesser von 6 mm ein (s. Abb. 3.3).

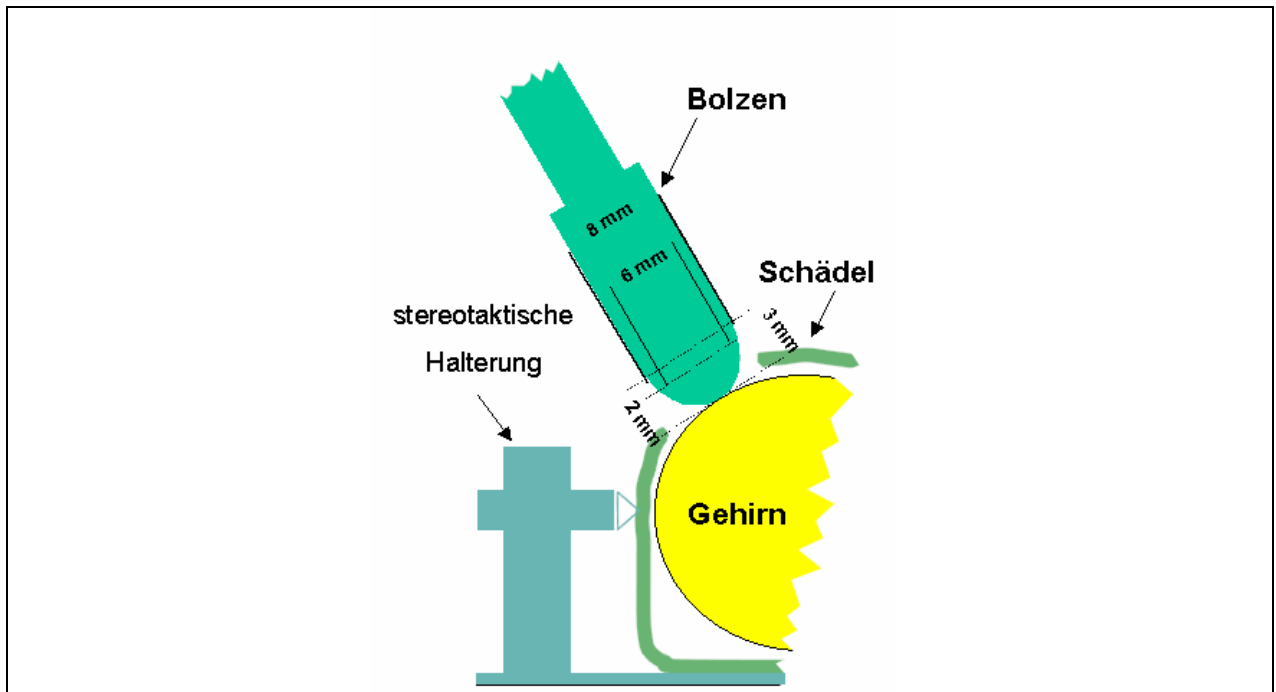


Abb. 3.3: Schemazeichnung der Bolzen-Positionierung

Die Geschwindigkeit des Bolzens von ca. 7 m/s wurde durch einen Impaktionsdruck von 100 psi (100 lbs/in² // entspricht ca. 7 bar) erreicht. Der Rückholdruck wurde exakt auf 13 psi, entsprechend ca. 0,9 bar, eingestellt. Die Kontaktzeit betrug ca. 300 ms.

Das CCII-Traumamodell ermöglichte die Kontrolle dieser Parameter über einen linear variablen Differentialtransformer (LVDT). Dieser bestand aus zwei um die bewegliche Bolzenstange angebrachten Spulen. Das Signal der durch die Bolzenbeschleunigung hervorgerufenen Induktionsänderung wurde via eines Interfaces (ATC – 101 Analog Transducer Controller, Fa. Lucas Schaevitz) und einer ISA-Lab-View PC-Karte an einen PC (CPU: 486 Arbeitsspeicher 8 MB) übertragen. Dieser setzte die Daten mit einer speziellen Software (Lab View Graphical Programming for Instrumentation Ver. 3.1.1. ©1995, Fa. National Instruments) graphisch um.

Nach Applikation des Traumas wurde insbesondere auf die Atmung und den mittleren arteriellen Blutdruck des Tieres geachtet. Die Kraniektomie wurde nur bei den Tieren, die zusätzlich im MRT-Messungen unterzogen werden sollten, nach ungefähr 10 Minuten mit dünnsschichtig aufgetragenem Zahnzement (Zinkphosphatzement, Fa. Richter & Hoffmann

Harvard Dental GmbH, Berlin) verschlossen, um bei den später folgenden MRT-Messungen einen besseren Kontrast des Traumaareales zu den umgebenden Weichteilen zu gewährleisten. Auf die Zementanlage folgte der einschichtige Verschluß der Wunde (Prolene monofil 4/0, Fa. Ethicon, Norderstedt).

3.2.4 Magnetresonanztomographische (MRT) -Anlage und Software

Für die magnetresonanztomographischen Untersuchungen stand in der Abteilung für Kernspintomographie (Institut für radiologische Diagnostik, Universitätsklinikum Benjamin Franklin, Freie Universität Berlin) ein 100 MHz Tomograph (Bruker Biospec 24/40) mit einem supraleitenden, 40 cm weiten Horizontal-Magneten (NbTi-Spulen der Fa. Bruker, Karlsruhe) einer Magnetfeldstärke von 2,35 Tesla zur Verfügung. Der Tomograph verfügte außerdem über ein aktiv abgeschirmtes Gradienten-Spulen-Rohr mit einer Gradientenstärke von 50mT/m (Maximalwert).

Die Steuerung des Tomographen sowie die Signalakquisition wurde über eine Silicon Graphics IRIS-4D30 Personal Workstation (128 Mbyte / IRIX 4.0.5F Unix-Betriebssystem) vorgenommen, die den Empfänger und den Synthesizer über einen Aspect-3000-Rechner ansteuert. Als Steuerungs- und Bildakquisitionssoftware wurde Xwin-NMR mit einem Paravision TM-Modul verwendet.

Für die Signalakquisition wurde eine ^1H -Oberflächenspule (50 mm Durchmesser) eingesetzt, die in Zusammenarbeit mit Professor Vollmann, Technische Fachhochschule Berlin, entwickelt wurde. Diese wurde über dem Traumabezirk bzw. dem Schädel positioniert.

3.2.5 MRT-Messreihe

Unter kontinuierlicher Isofluranzufuhr (0,5 l/min N_2O , 0,3 l/min O_2 , 2,0 Vol. % Isofluran) wurden die Tiere auf einer eigens für diesen Zweck angefertigten und auf die Bohrung der MRT-Anlage angepassten Positionierungs-Halterung fixiert, auf der sich ein - vergleichbar mit dem zur Trepanation verwendeten - stereotaktischer Halter befand. Über die konisch zulaufenden und in beide meati acustici externi eingeführten Halterungen wurde der Rattenschädel in der koronaren und transversalen Ebene fixiert. Die Fixierung in der sagittalen Ebene erfolgte über einen im Bereich der Schnauze des Tieres positionierten,

longitudinal spannbarer Bügel, in dessen Öffnung die Schneidezähne des Tieres einhakten. Zusätzlich wurde die Schnauze des Tieres über einen den Nasenrücken umschlingenden Gummizügel nach unten in dieser Position gehalten. So wurde der Schädel in allen Ebenen fixiert und die durch Atmungsexkursionen entstehenden Bewegungsartefakte auf ein Minimum reduziert.

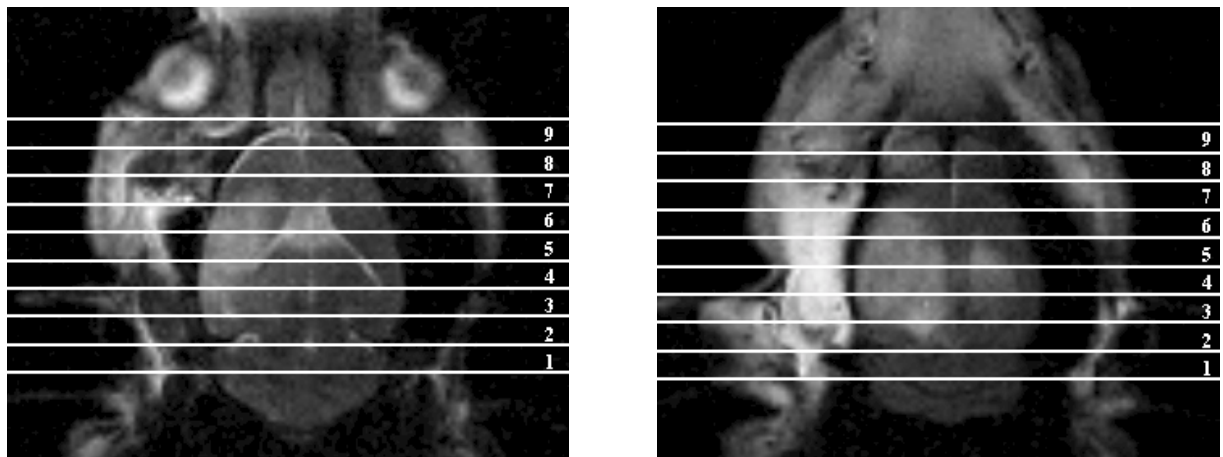
Das Tier konnte durch den stereotaktischen Halter und die Positionierungs-Halterung innerhalb der Bohrung des Tomographen im Zentrum des Magneten millimetergenau gelagert werden, so daß die Schichtpositionen der verschiedenen Meßzeitpunkte und auch der Tiere untereinander (eine geringe interindividuelle anatomische Varianz berücksichtigt) identisch waren.

Der Körper des Tieres lag gepolstert in einem Teflon-Halbrohr. Dieses ließ durch eine ca. 3 cm x 8 cm messende ovale Öffnung die Positionierung eines modifizierten Urinauffangbeutels an der Unterseite des Tieres zu. Dieser war zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur des Tieres über einen Zu- und Abfluß mit einer über die rektale Temperatursonde rückgekoppelten Hydrowärmeeinheit verbunden. Auch hier wurde die Körpertemperatur zwischen 36,5 °C und 37,5 °C gehalten. Zur zusätzlichen Kontrolle wurde ein weiteres elektronisches Thermometer verwendet, das ebenfalls rektal maß und dessen Anzeige auch im Kontrollraum zu sehen war.

Auf dem oben erwähnten Bügel zur Fixierung der Schneidezähne war eine Narkose-Zuführung und -Absaugung in ähnlicher Weise montiert wie sie bei der Kraniektomie verwendet wurde.

3.2.6 Die T2- und T1-gewichteten Sequenzen

Die Messreihen setzten sich aus T2- und T1-gewichteten Sequenzen zusammen. Am Anfang wurde immer eine T2-gewichtete Scout-Übersichtsaufnahme (s. Abb. 3.4) in transversaler Schichtführung akquiriert, an der die folgenden Sequenzen geometrisch angepasst wurden, so daß die Bezugspunkte bei allen Tieren gleich und auch über die verschiedenen Messreihen hin konstant blieben.



Scout-Aufnahme zur Schichtpositionierung

2 mm weiter kranial gelegene Scout-Aufnahme

Abb. 3.4: Transversale Scout-Aufnahmen zur Schichtpositionierung

Dabei lag Schicht Nr. 5 im Zentrum der Läsion, die Schichten Nr. 3-4 okzipital und Nr. 6-7 frontal. Die T2-gewichtete Bildgebung wurde anhand einer RARE-Sequenz vorgenommen (Parameter s. Tab.3.1).

Zur Auswertung der verschieden gewichteten MRT-Bilder erfolgten die Einstellungen der Matrixgröße (Auflösung), der Schichtdicke und -position sowie des abgebildeten Areals (Field of View) bei allen Sequenzen immer gleich.

T2-gewichtete RARE-Sequenz

Nucleus	^1H
Repetitionszeit	3300 ms
Echozeit	11 ms
Effektive Echozeit	88 ms
Rare-Faktor	16
Anzahl der Mittelungen	4
Gesamtmeßzeit	1 min 50 s
Matrixgröße	128 x 128 Pixel
Schichtdicke	2 mm
Schichtabstand	0 mm
Anzahl der Schichten	9
Field of View	42,5 mm
Schicht-Schema	sequentiell
Puls-Form	Hermite
Verstärkung	
$\pi/2$ -Attenuation	20 dB
π -Attenuation	13 dB
Receiver Gain	120 dB

Tab. 3.1: PARAVISION-Parameter der T2-gewichteten Sequenz

Der venöse Zugang für die Kontrastmittelapplikation im Rahmen der T1-gewichteten Bildgebung wurde vor der Positionierung des Tieres im Magnetfeld durch Punktion einer lateralen Schwanzvene mit einer Venenverweilkanüle (Neoflon® 24G / 19 mm; Helsingborg, Schweden) gelegt. Nach einer T1-Nativaufnahme wurde der Katheter zuerst mit 0,9 % physiologischer NaCl-Lösung angespült, daraufhin das Kontrastmittel Magnevist® (Gadopentensäure, Dimeglumin-Salz; Fa. Schering) in einer Dosierung von 0,1 mg/kg KG appliziert und mit 0,4 ml 0,9 % NaCl-Lösung nachgespült.

Zur Erfassung der Verteilung des Kontrastmittels wurden 30 Sekunden nach der Kontrastmittelapplikation weitere T1-Aufnahmen im 5 Minuten-Intervall gestartet (Parameter s. Tab.3.2).

T1-gewichtete MSSE-Sequenz

Nucleus	¹ H
Repetitionszeit	500 ms
Echozeit	11 ms
Anzahl der Mittelungen	8
Gesamtmeßzeit	4 min 20 s
Matrixgröße	128 x 128 Pixel
Schichtdicke	2 mm
Schichtabstand	0 mm
Anzahl der Schichten	9
Field of View	42,5 mm
Schicht-Schema	sequentiell
Puls-Form	Hermite
Verstärkung	
$\pi/2$ -Attenuation	19 dB
π -Attenuation	13 dB
Receiver Gain	250 dB

Tab. 3.2: PARAVISION-Parameter der T1-gewichteten Sequenz

Nach Beendigung der Messreihe wurde das Tier aus der Fixierung gelöst, die Narkosezufuhr beendet und mit 0,8 l O₂ / min ventiliert. Der venöse Zugang konnte zwischen der 90-Minuten- und der 6 Stunden-Messung in situ belassen werden, mußte danach aber entfernt werden.

Zwischen den Messungen 24-, 48- und 168-Stunden nach Trauma hatten die Ratten in ihren Käfigen freien Zugang zu Futter und Wasser.

Die Gehirnentnahme erfolgte im Anschluß an die letzte Messung, d.h. eine Woche nach Trauma.

3.2.7 Verabreichung des Bradykinin-B₂-Rezeptorantagonisten LF 16.0687 Ms

Der spezifische Bradykinin-B₂-Rezeptorantagonist LF 16.0687 Ms (Laboratoires Fournier, Daix, Frankreich) in den Dosierungen 3mg/kg KG und 30mg/kg KG bzw. die entsprechende Menge 0,9 % NaCl-Lösung wurde fünf Minuten nach der Kontusionierung subkutan in den linken unteren Quadranten des Abdomens injiziert. Bei allen Tieren zeichnete sich dort eine deutliche Quaddel ab. Während der Applikation, 1 Minute danach und im 5-Minuten-Abstand bis 20 Minuten nach Injektion wurde zur Erfassung einer eventuellen vasoaktiven Wirkung der Substanz der Blutdruck protokolliert.

Im Rahmen der magnetresonanztomographischen Untersuchungen wurde nach dem gleichen Schema vorgegangen. Aus technischen Gründen erfolgte keine Erfassung des Blutdruckes. Ausgehend von den Ergebnissen der ersten Studie wurde der B₂-Rezeptor-Antagonist nur in der niedrigen Dosierung verabreicht. Die bereits oben erwähnten MRT-Messreihen wurden zu den Zeitpunkten 6 und 24 Stunden durchgeführt und das Gehirn direkt im Anschluß an die letzte Messung entnommen. Daran anschließend wurde der Schwellungswert sowie der Wassergehalt der einzelnen Hemisphären gravimetrisch bestimmt.

3.2.8 Überwachung des mittleren arteriellen Blutdruckes (MABP)

Zur Messung des arteriellen Blutdruckes (MABP) wurde die rechte Femoralarterie kanüliert. Nach der Rasur und Inzision der Leistenregion wurde die nach oben verlaufende A.femoralis superficialis mittels einer Bipolarpinzette (Koagulationsgerät Typ T100, Fa. Aesculap-Werke AG, Tuttlingen) koaguliert. Die A. femoralis wurde aus ihrem bindegewebigen Bett von der parallel verlaufenden V. femoralis und dem N. femoralis bis zum Lig.inguinale gelöst, danach distal ligiert und proximal angezügelt (Ligatur: Seide geflochten 0,5 metr. 7/0, Fa. Ethicon, Norderstedt). Nach der Inzision mit einer Mikroschere wurde die Arterie mit einem Kunststoffkatheter (Polythene Tubing, Innendurchmesser = 0,28 mm, Außendurchmesser = 0,61 mm, Fa. Portex, England) katheterisiert. An dessen Ende wurde eine modifizierte Kanüle (Luer 24G x 1“, 0,55 x 25, Fa. Braun, Melsungen) aufgesteckt, um den Katheter mit dem Druckaufnehmer (Einmaltransducer zur invasiven Blutdruckmessung, Fa. Abbott, Wiesbaden) zu verbinden. Der Katheter wurde sowohl durch direktes Anknoten als auch durch eine Sicherheitsschleife gesichert und die Wunde einschichtig mit Prolene[®] (Prolene monofil 4/0, Fa. Ethicon, Norderstedt) verschlossen. Der Verlegung des Katheters durch Thrombenbildung wurde bei Abflachung der Blutdruckkurve

durch kurzes Anspülen mit isotoner 0,9 % NaCl-Lösung vorgebeugt. So wurde hier der Einsatz von Heparin vermieden.

Nach Beendigung der Blutdruckmessung wurde das proximale Ende des arteriellen Katheters ligiert. Es folgte der einschichtige Verschluß des Hautschnittes und die Narkoseausleitung.

3.2.9 Blutentnahmen

Zur arteriellen Blutgasanalyse (BGA) (Gerät: Spectrometer Kopenhagen ABL 520, Fa. Spectrometer Kopenhagen, Willich) wurden ca. 0,2 ml Blut mit einer heparinisierten 1ml Spritze (Omnifix - F 1ml, Fa. Braun, Melsungen) abgenommen (vorher wurde der Katheterinhalt mit einer NaCl-gefüllten Spritze zur Säuberung des Katheters aspiriert). Hierbei wurden die Parameter: pH, pO₂, pCO₂, Standardbicarbonat, Basenüberschuß und der Hämoglobingehalt bestimmt.

Diese Blutentnahmen fanden vor Trauma, 25 Minuten und 5 Stunden nach CCII sowie kurz vor der Hirnentnahme (24h nach CCII, nach erneuter Kanülierung des schon zuvor verwendeten Gefäßes) unter kontrollierter Narkose der Tiere statt. Nach der Blutentnahme 5 Stunden nach Trauma wurde der Katheter vollständig entfernt, die Femoralarterie ligiert und die Wunde einschichtig verschlossen.

3.2.10 ICP-Messung

24 Stunden nach Traumatisierung erfolgte eine erneute Katheterisierung der rechten A. femoralis in Narkose. Zur Positionierung der ICP-Sonde wurden die Ratten in den stereotaktischen Rahmen eingespannt. Zur Messung des intrakraniellen Druckes (ICP) wurde auf der kontralateralen Seite der Kalotte ein Bohrloch gesetzt, das 3 mm von der Sutura sagittalis und ungefähr auf Höhe des Traumaareals positioniert wurde.

Die ICP-Sonde (Microsensor ICP Transducer, Fa. Codmann & Shartleff Inc., Randolph USA) wurde über ein Interface (Interface control unit 82-6605, Fa. Codmann & Shartleff Inc., Randolph USA) mit dem ICP/Blutdruck/Temperatur-Monitor (Hellige Servomed) verbunden. Über einen am stereotaktischen Rahmen befestigten und feinjustierbaren Arm (Mikromanipulator) wurde die Sonde dann 6 mm in das Parenchym der kontralateralen Hemisphäre vorgeschoben und der ICP über 10 Minuten gemessen. Die ICP-Messung wurde

aufgrund der Invasivität und der damit verbundenen möglichen Beeinflussung der Schwellungswerte insbesondere der nicht-traumatisierten Hemisphäre nur einmalig, kurz vor der Hirnentnahme vorgenommen.

3.2.11 Entblutung des Tieres und Hirnentnahme

Nach der ICP-Messung wurde das Tier entblutet. Dazu wurde ungefähr in Höhe der Injektionsstelle die Haut eingeschnitten, wobei der subkutan gelegene Injektionsbereich auf eventuelle lokale Reaktionen untersucht werden konnte. Anschließend wurde zur Entblutung der Tiere die Bauchhöhle eröffnet und die linke V. renalis durchtrennt. Sobald die daraus resultierende Blutung an Stärke abnahm, wurde die A. renalis und abschließend die Aorta abdominalis durchtrennt. Diese Vorgehensweise entleerte die venösen zerebralen Sinus vollständig.

Die Gehirne wurden durch Entfernung des Schädelknochens in situ freipräpariert. Zuerst wurde der Hirnstamm mit einem Schnitt durch die Vierhügelplatte genau zwischen den Colliculi superiores und den Colliculi inferiores getrennt und darauf das Großhirn vom Rhinencephalon durch einen Schnitt zwischen den frontalen Polen und den Bulbi olfactorii abgesetzt.

Ohne Unterbrechung folgte darauf die Trennung der Hemishären unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskops (Zeiss OPMI6-SFC, Zeiss Germany). Um die Hemisphären exakt in der Mitte trennen zu können, mußten bei größeren Schwellungswerten die Hemisphären mit einer Pinzette auseinandergedrängt und die angenommene Mittellinienverlagerung ausgeglichen werden. Der Trennungsfehler, d.h. die Abweichung von der „idealen Mittellinie“ konnte auf diese Weise so gering wie möglich gehalten werden. Auf die Bedeutung des Trennungsfehlers wird in Abschnitt 3.3.2.2 (S. 27) näher eingegangen.

3.3 Auswertungsmethoden

3.3.1 Auswertung der MRT-Bilddaten

Die durch die Steuerungs- und Bildakquisitionsoftware Xwin-NMR mit einem Paravision TM-Modul gewonnenen 32-bit Bilddaten wurden anhand einer Konvertierungsroutine zu TIFF (Tagged Image File Format), US (Unsigned Short) und long-Bildformaten konvertiert. Diese Routine wurde durch die Abteilung für Medizinische Informatik (Professor Tolxdorff) entwickelt und ermöglichte eine Kompatibilität zu der DOS bzw. Windows-basierten Bildbearbeitungssoftware NIH- bzw. Scion-Image (Fa. Scion Corporation, USA).

3.3.1.1 Bestimmung des Ödemvolumens

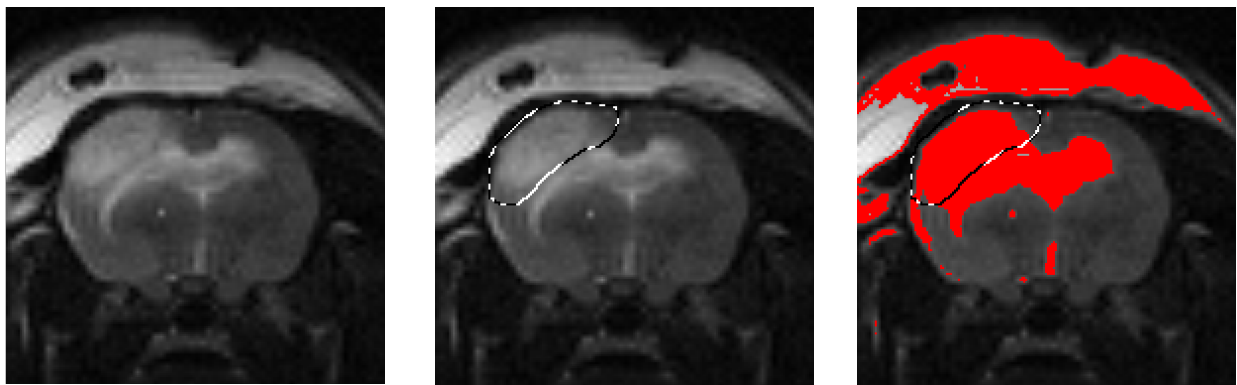
Die Bestimmung des Ödemvolumens zu den verschiedenen Meßzeitpunkten wurde anhand der in der T2-gewichteten Bildgebung gewonnenen Bilddaten vorgenommen. Hierzu wurden die Daten jeder einzelnen akquirierten Schicht im Unsigned Short-Format (.us) analysiert.

Die Läsion wurde zuerst in der Schicht mit der größten Ödemausbreitung grob umrandet und dann mittels einer programmeigenen Funktion („density slice“) genau markiert (s. Abb. 3.5). Dies ermöglichte die segmentierte Betonung eines schmalen Spektrums der Graustufenwerte, das diejenigen Graustufenwerte des Gesamtbildes enthielt, welche Kontusion und Ödem abbildeten. Nachdem dieser Graustufenwert-Bereich auf die übrigen Schichten übertragen wurde, konnte die Fläche der segmentierten Heraushebung der Graustufenwerte vermessen werden. Auf diese Weise wurde das Läsionsareal für jede einzelne Schicht bestimmt.

Das in Pixeln angegebene Ergebnis mußte nun in das Pixel-Millimeter-Äquivalent (PMÄ) umgerechnet werden. Dazu wurde die Matrix (128 x 128 Pixel) anhand des Field of View (FoV / z.B. 42,5 mm x 42,5 mm) in Quadratmillimeter umgerechnet:

$$PMÄ = \frac{FoV}{Matrixgröße}$$

Um das Volumen zu berechnen, wurden die für die einzelnen Schichten erhaltenen Werte mit der Schichtdicke (hier: 2mm) multipliziert und dann addiert.



T2-gewichtete Aufnahme

Markierung des Kontusions- /
ÖdemarealesHeraushebung der spez.
Graustufenwerte

Abb. 3.5: Bestimmung des Ödemareals in der T2-gewichteten Bildgebung (Schicht 5)

3.3.1.2 Bestimmung des relativen Anteils des Ödemareals an der Hemisphäre

Zur Bestimmung des relativen Anteiles des Ödemvolumens an der traumatisierten Hemisphäre wurde diese vermessen, wobei die vorhandene Mittellinienverlagerung berücksichtigt wurde. Dabei wurde die Hemisphäre mit einem in die oben angegebene Auswertungssoftware integrierten Umrandungstool an den äußeren Rändern umfahren und die Mittellinie anhand des mittig liegenden III. Ventrikels bzw. Aqueductus cerebri nachgezogen (s. Abb. 3.6).



Abb. 3.6: Bestimmung des Volumens der traumatisierten Hemisphäre (Schicht 5)

Dieser Vorgang wurde für jedes Bild dreimal wiederholt und die so gewonnenen Werte gemittelt. Diese Flächen wurden ebenfalls in das Pixel-Millimeter-Äquivalent (PMÄ) und schließlich zu einem Gesamtvolumen umgerechnet. Zusammen mit den zuvor berechneten Ödemvolumina konnte der prozentuale Anteil des Ödems am Volumen der traumatisierten Hemisphäre berechnet werden:

$$\text{Ödem/ Hemisphären-Verhältnis} = \frac{(\text{Ödemvolumen})}{(\text{Hemisphärenvolumen})} * 100$$

3.3.1.3 Bestimmung der hemisphäralen Schwellung

Das Gesamthirn wurde auf die gleiche Weise wie die traumatisierte Hemisphäre dreimal umrandet (s. Abb. 3.7). Anhand der so gewonnenen Werte wurde durch Subtraktion des Volumens der traumatisierten Hemisphäre vom Hirngesamtvolumen das Volumen der nicht-traumatisierten Hemisphäre ermittelt. So konnte analog zur gravimetrischen Analyse der Anteil der hemisphäralen Schwellung der traumatisierten Hemisphäre an der nicht-traumatisierten Hemisphäre bestimmt werden.

$$\text{Hemisphärale Schwellung} = \frac{(\text{tr.Vol.}) - (\text{ges.Vol.} - \text{tr.Vol.})}{(\text{ges.Vol.} - \text{tr.Vol.})} * 100$$

Ges. Vol. = Volumen des Gesamthirnes **tr. Vol.** = Volumen der traumatisierten Hemisphäre
n.tr.Vol. = Volumen der nicht-traumatisierten Hemisphäre

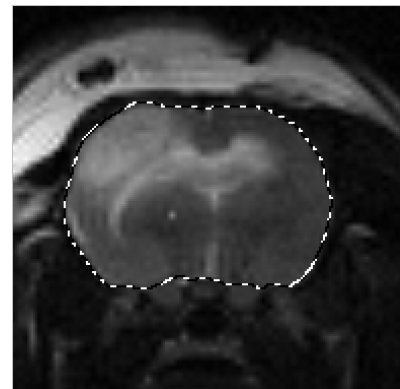


Abb. 3.7: Bestimmung des Gesamthirn-Volumens (Schicht 5)

3.3.1.4 Bestimmung der Kontrastmittelextravasation

Die Bestimmung der Kontrastmittelextravasation bzw. des Kontrastmittelrückhaltes wurde anhand T1-gewichteter Bilder vorgenommen. Vor Kontrastmittelapplikation wurde eine Nativ-T1-Aufnahme und nach Kontrastmittelapplikation vier Postkontrast-T1-Aufnahmen im 5-Minuten-Intervall akquiriert.

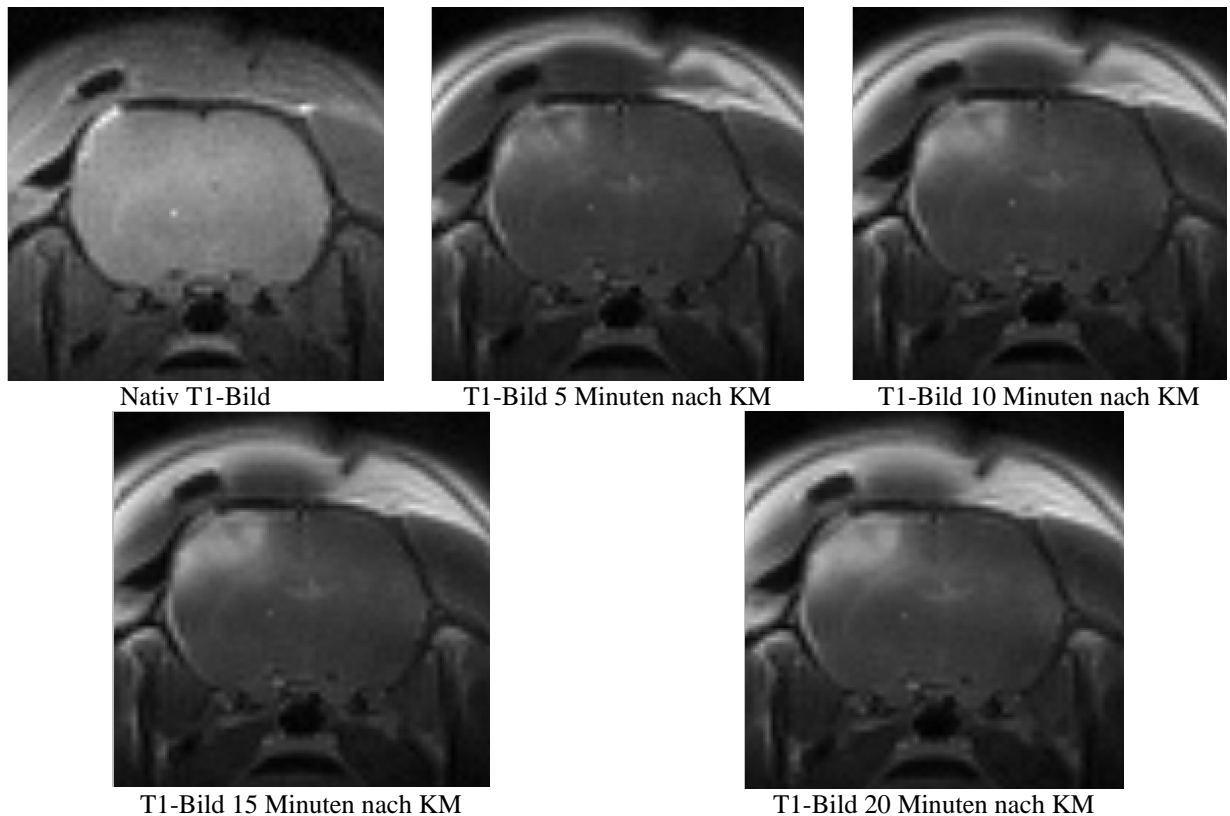


Abb. 3.8: Anflutung des Kontrastmittels in der T1-gewichteten Bildgebung 24 h nach CCII

Um den relativen Zuwachs an Kontrastmittelextravasation zwischen den vier Postkontrast-T1-Aufnahmen zu ermitteln (s. Abb. 3.8), wurde das Kontrastmittelextravasationsareal in der ersten Aufnahme nach Kontrastmittelgabe mit Hilfe der eingebauten Funktion *Density Slice* markiert und mit dem Umrandungstool grob umrandet. Die vorgenommene Umrandung konnte anhand einer programmierten Makro-Routine auf die korrespondierenden Schichten der weiteren drei Postkontrast-T1-Aufnahmen übertragen werden. Die programmierte Makro-Routine übernahm ebenfalls die Messung des Läsionsareals nach vorheriger Festlegung des Spektrums der im Läsionsareal vorkommenden Signalintensitäten (Graustufenwerte). Somit konnte ein Zuwachs oder eine Abnahme der Kontrastmittelextravasation zwischen den vier Postkontrast-T1-Aufnahmen festgestellt werden.

Die Zu- oder Abnahme wurde außerdem anhand der Differenz der Signalintensitäten (Graustufen) zwischen der gesamten traumatisierten und nicht-traumatisierten Hemisphäre und anhand spezifischer Meßpunkte innerhalb der beiden Hemisphären bestimmt.

Dafür wurde zuerst auf der Nativ T1-gewichteten Aufnahme die traumatisierte Hemisphäre mit dem Umrandungstool der Bildauswertungssoftware markiert und anschließend durch eine speziell programmierte Makro-Routine auf die korrespondierenden Schichten der nach der Kontrastmittelapplikation folgenden Aufnahmen kopiert. Die mittleren Signalintensitäten (Graustufenwerte) wurden ebenfalls im Rahmen dieser Routine erfaßt. Danach wurde zur Ermittlung der Signalintensitäten der nicht-traumatisierten Hemisphäre diese Hemisphäre umrandet und in der oben beschriebenen Weise vorgegangen (s. Abb. 3.9).

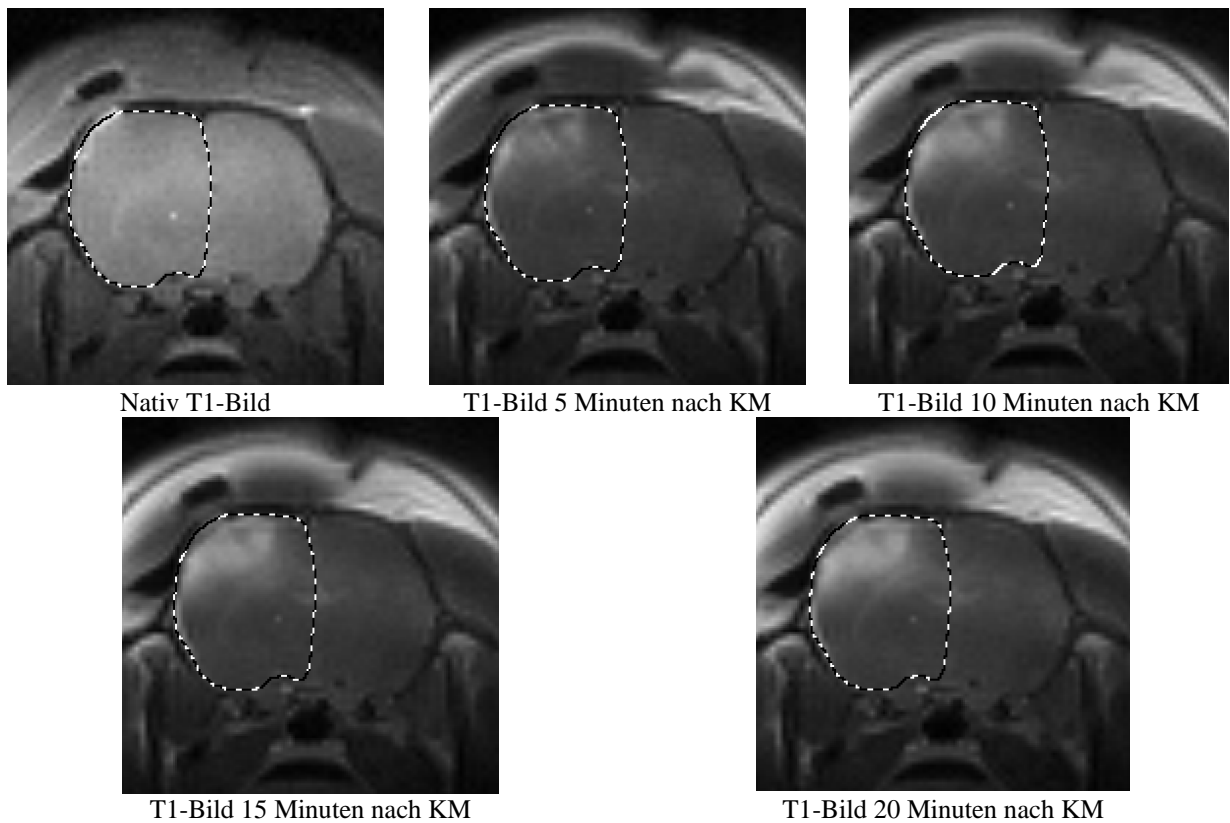


Abb. 3.9: Markierung der traumatisierten Hemisphäre in den T1-gewichteten Bildern

Aus den so gewonnenen Werten konnte nun die Differenz der Signalintensitäten zwischen traumatisierter und nicht-traumatisierter Hemisphäre ermittelt werden. Dazu wurde der Grad der Kontrastverstärkung (Degree of Contrast Enhancement) bestimmt (Holodny et al., 1999):

$$\text{Grad der Kontrastverstärkung(\%)} = \frac{SI_{(tr.)} - SI_{(n.tr.)}}{SI_{(n.tr.)}} * 100$$

SI = Signalintensität **tr.** = traumatisierte Hemisphäre **n.tr.** = nicht-traumatisierte Hemisphäre

Ähnlich wurde bei der Messung spezifischer, in Richtung des Kontusionsstoßes liegender Meßpunkte (1: Läsionszentrum; 2: Ödemperipherie/Hippocampusregion; 3: Basalganglien-region) innerhalb der Hemisphären vorgegangen (s. Abb. 3.10).

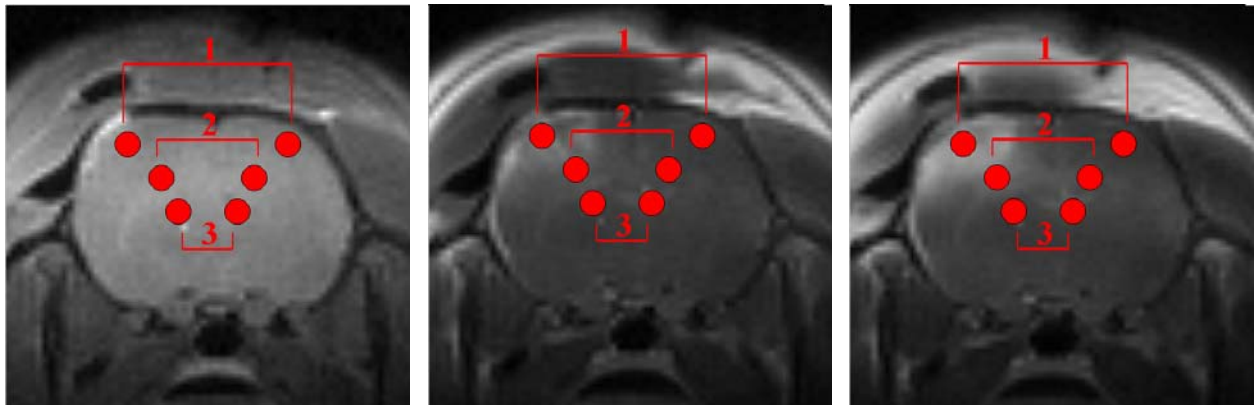


Abb. 3.10: Spezifische Stoßrichtungs-Messpunkte in der traumatisierten und nicht-traumatisierten Hemisphäre (Schicht 5)

Außerdem wurden noch Meßpunkte, die nur innerhalb des Kortex lagen (1: Läsionszentrum; 2: Ödemperipherie 1; 3: Ödemperipherie 2; 4: Weiter entfernter Kortex) untersucht (s. Abb. 3.11). Dies erlaubte den Grad der Kontrastverstärkung zwischen dem Meßpunkt innerhalb traumatisierten Hemisphäre und dem korrespondierenden Punkt der nicht-traumatisierten Hemisphäre zu vergleichen.

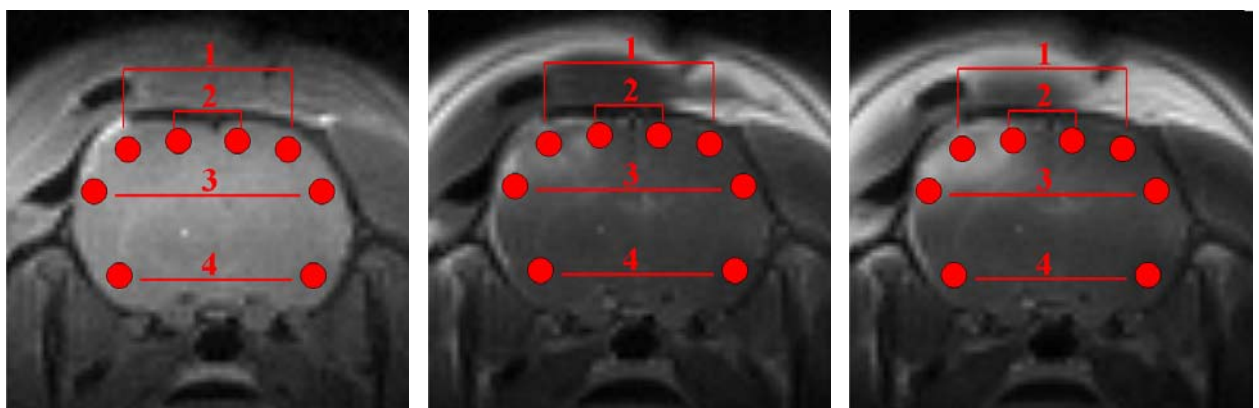


Abb. 3.11: Spezifische Kortex-Messpunkte in der traumatisierten und nicht-traumatisierten Hemisphäre (Schicht 5)

3.3.2 Gravimetrische Bestimmung der posttraumatischen Hemisphärenschwellung

Die Hemisphärenschwellung wurde anhand des Feucht- und Trockengewichts gravimetrisch bestimmt. Hierzu wurden spezielle Wäagegläschen, die zuvor 24 Stunden in einem Trockenschrank (Typ T6060, Fa. Heraeus Instruments, Hanau) bei 110°C zur Entfernung der Luftfeuchtigkeit getrocknet wurden mit einer Feinwaage gewogen (Analytic Waage Typ A 210 P-OD1, Fa. Sartorius GmbH, Tuttlingen).

Die Hemisphären wurden unmittelbar nach ihrer Trennung in die kurz zuvor gewogenen Wäagegläschen gegeben. Das Einzelgewicht der jeweiligen Hemisphäre errechnet sich folglich aus der Differenz des Gesamtgewichtes und des Gewichtes des Wäagegläschens.

Der Schwellungswert der traumatisierten Hemisphäre wurde mit folgender Formel aus den Feuchtgewichten der beiden Hemisphären berechnet [modifiziert nach (Elliot et al., 1949)]:

$$\text{Schwellung}(\%) = \frac{Fg(tr.) - Fg.(n.tr.)}{Fg(n.tr.)} * 100$$

Fg = Feuchtgewicht **tr.** = traumatisierte Hemisphäre **n.tr.** = nicht-traumatisierte Hemisphäre

Wie aus der Formel ersichtlich, wird die Schwellung durch die nicht exakte Trennung beeinflusst. Bei einem positiven Trennfehler hat man die Hemisphären zu Gunsten der traumatisierten Hemisphäre getrennt. Bei einem negativen Trennfehler hat man zu Gunsten der nicht-traumatisierten Hemisphäre getrennt.

3.3.2.1 Zerebraler Wassergehalt

Nach Bestimmung des Feuchtgewichtes wurden die Hemisphären bei 110°C für 24 Stunden getrocknet. Durch die Ermittlung des Trockengewichtes der jeweiligen Hemisphären wurde nun der zerebrale Wassergehalt der einzelnen Hemisphären wie folgt bestimmt:

$$\text{Wassergehalt}(\%) = \frac{Fg - Tg}{Fg} * 100$$

Fg = Feuchtgewicht **Tg** = Trockengewicht

3.3.2.2 Bestimmung des Trennfehlers

Anhand der Trockengewichte der traumatisierten Hemisphäre und der nicht-traumatisierten Hemisphäre wurde der Trennfehler berechnet:

$$\text{Trennfehler}(\%) = \frac{Tg(tr.) - Tg(n.tr.)}{Tg(tr.)} * 100$$

Tg = Trockengewicht **tr.** = traumatisierte Hemisphäre **n.tr.** = nicht-traumatisierte Hemisphäre

Aufgrund einer nicht auf der idealen Mittellinie verlaufenden Trennung der beiden Hemisphären konnte der Trennfehler zu groß ausfallen. Je nachdem zugunsten welcher Hemisphäre man getrennt hatte, war der berechnete Wert der hemisphäralen Schwellung entsprechend zu groß oder zu klein. Bei Trennfehlern größer als 2,5 % wurde die untenstehende Korrekturformel angewandt (Deisenroth et al., 1990):

$$\text{korr.Schwellung}(\%) = \left(\left(\frac{Fg(tr.)}{Fg(n.tr.)} * \frac{Tg(n.tr.)}{Tg(tr.)} \right) - 1 \right) * 100$$

Fg = Feuchtgewicht **Tg** = Trockengewicht **tr.** = traumatisierte Hemisphäre
n.tr. = nicht-traumatisierte Hemisphäre

3.3.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte anhand des Programms SigmaStat 2.0 (Jandel Scientific, San Rafael, USA), die graphische Darstellung der Ergebnisse mit Hilfe des Programms SigmaPlot 5.0 (Jandel Scientific, San Rafael, USA).

Zur statistischen Auswertung für Veränderungen im zeitlichen Verlauf wurde die Varianzanalyse (ANOVA) vorgenommen, gefolgt von der post-hoc Korrektur (Tukey-Test) für den paarweisen mehrfachen Vergleich. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ angenommen. Die Datendarstellung erfolgte als Mittelwert \pm Standardfehler. Korrelationen wurden mit dem Spearmanschen Korrelationskoeffizienten beschrieben.

4. Ergebnisse

4.1 Dynamik der posttraumatischen perifokalen Hirnödemen-Entwicklung nach CCII

Die Veränderungen der hemisphäralen Schwellung und der Kontrastmittelextravasation im zeitlichen Verlauf wurde an 9 Ratten mittels MRT-Messungen zu den Zeitpunkten 90 Minuten, 6, 24 und 48 Stunden sowie 7 Tage nach Trauma ermittelt. Hierbei zeigte sich eine signifikante und zum Teil reversible Vergrößerung von Kontusion und Hirnödem.

4.1.1 T2-gewichtete Bildgebung

In den T2-gewichteten Bilddaten ergaben sich folgende prozentuale hemisphärale Schwellungswerte:

Innerhalb der ersten 90 Minuten nach CCII kam es zum stärksten Anstieg der hemisphäralen Schwellung auf $5,84 \pm 0,59$ % (90 min). Dann kam es zu einer kontinuierlichen Zunahme über $9,56 \pm 1,11$ % (6 h) auf die maximale Ausdehnung zwischen $14,12 \pm 1,47$ % (24 h) und $15,24 \pm 1,49$ % (48 h). Gefolgt wurde diese Entwicklung von einer Abnahme bis 7 Tage nach CCII ($8,05 \pm 1,08$ %) (s. Abb. 4.1).

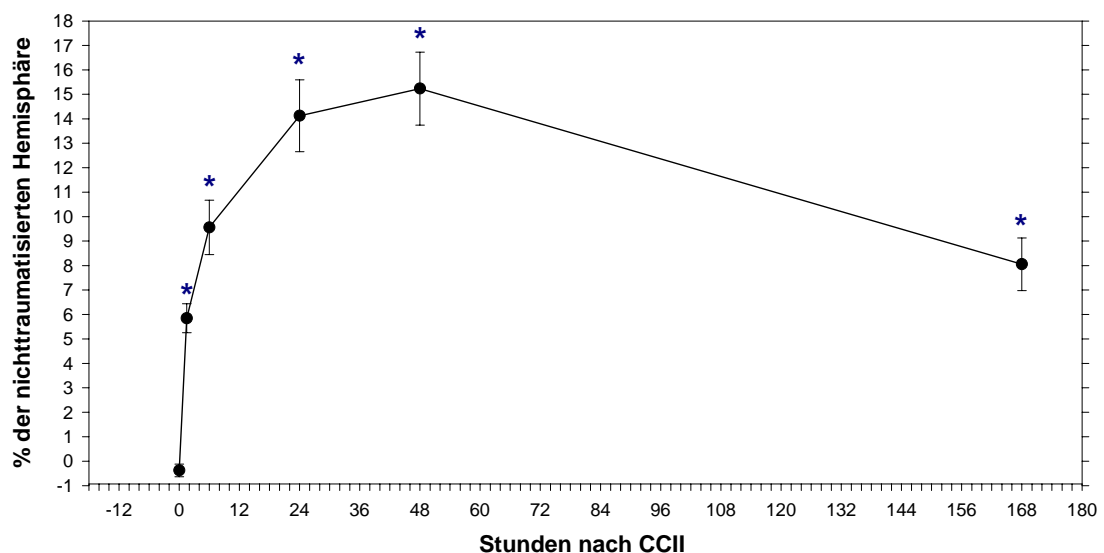


Abb. 4.1: Volumendifferenz zwischen traumatisierter und nicht-traumatisierter Hemisphäre (in Prozent der nicht-traumatisierten Hemisphäre)

Das Volumen der Kontusion bzw. des perifokalen Ödems innerhalb der traumatisierten Hemisphäre wies eine ähnliche Wachstumsdynamik auf (Abb. 4.2). Dies verdeutlichte auch, daß das Ödemvolumen innerhalb der Hemisphäre in Relation sich stärker vergrößerte als das Gesamtvolumen der Hemisphäre selbst. So betrug der Kontusion / Ödem-Anteil an der traumatisierten Hemisphäre 90 Minuten nach CCII $10,9 \pm 0,65 \%$ und nach 6 Stunden $18,4 \pm 1,18 \%$. Der Anteil war im Zeitraum von 24 bis 48 Stunden maximal ($24\text{h: } 23,2 \pm 0,94 \%$) und hier im Vergleich zum 90 Minutenwert und 7-Tagewert ($12,8 \pm 0,97 \%$) signifikant ($p < 0,05$, ANOVA-Test).

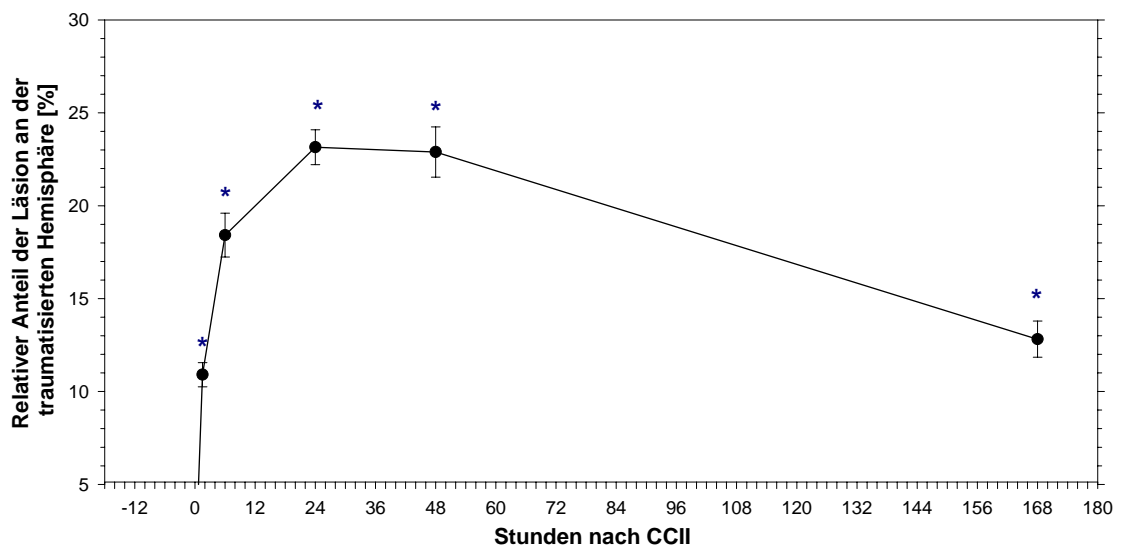


Abb. 4.2: Relativer Anteil des Kontusions- / Ödemvolumens am Volumen der traumatisierten Hemisphäre

4.1.2 T1-gewichtete Aufnahmen mit Kontrastmittelapplikation

4.1.2.1 Grad der Kontrastverstärkung

In der T1-gewichteten Bildgebung wurde zu den oben genannten Zeitpunkten zuerst eine Nativaufnahme und dann, nach Kontrastmittelapplikation, 4 aufeinander folgende Post-Kontrastmittelaufnahmen im 5 Minuten Abstand akquiriert.

Post-Kontrast-Bildgebung

Bis zur letzten Aufnahme, die ca. 20 Minuten nach Gadolinium-Injektion erfolgte, zeigte sich zu den Zeitpunkten 90 Min, 6, 24, 48 Stunden und 7 Tage nach CCII eine stete signifikante Zunahme der Kontrastverstärkung der traumatisierten Hemisphäre im Vergleich zur nicht-traumatisierten Hemisphäre (s.Abb. 4.3). Vor CCII waren die Werte beider Hemisphären gleich.

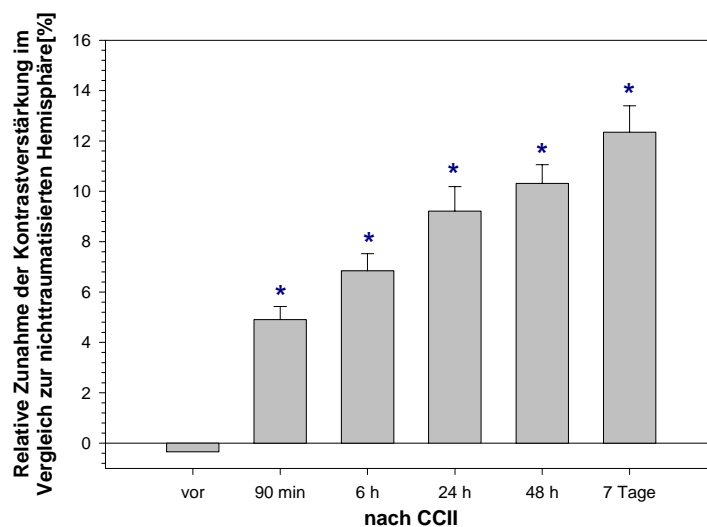


Abb. 4.3: Grad der Kontrastverstärkung 20 Minuten nach Kontrastmittelapplikation

Analyse spezifischer Punkte

Die genauere Betrachtung spezifischer Punkte innerhalb des Läsionszentrums im Vergleich mit in Stoßrichtung und kortikal gelegenen peripheren Meßpunkten ergab, daß die läsionszentralen und die perifokalen Meßpunkte in den Schichten 4-6 die größte KM-Extravasation 5 Minuten nach KM-Applikation aufwiesen. Hier war auch der Zuwachs an Kontrastverstärkung bis 20 Minuten nach Applikation am stärksten (siehe Abb. 4.4). Die Schichten 3 und 7 wiesen einen Zuwachs bis 48 Stunden nach CCII auf, die Schichten 4-6 erreichten 6 Stunden nach CCII ein Plateau, woran die voranschreitende periphere Ausbreitung des vasogenen Ödems ersichtlich wird. Die hohen Werte 7 Tage nach CCII lassen sich durch die Ausbildung einer nekrotischen Kavität erklären.

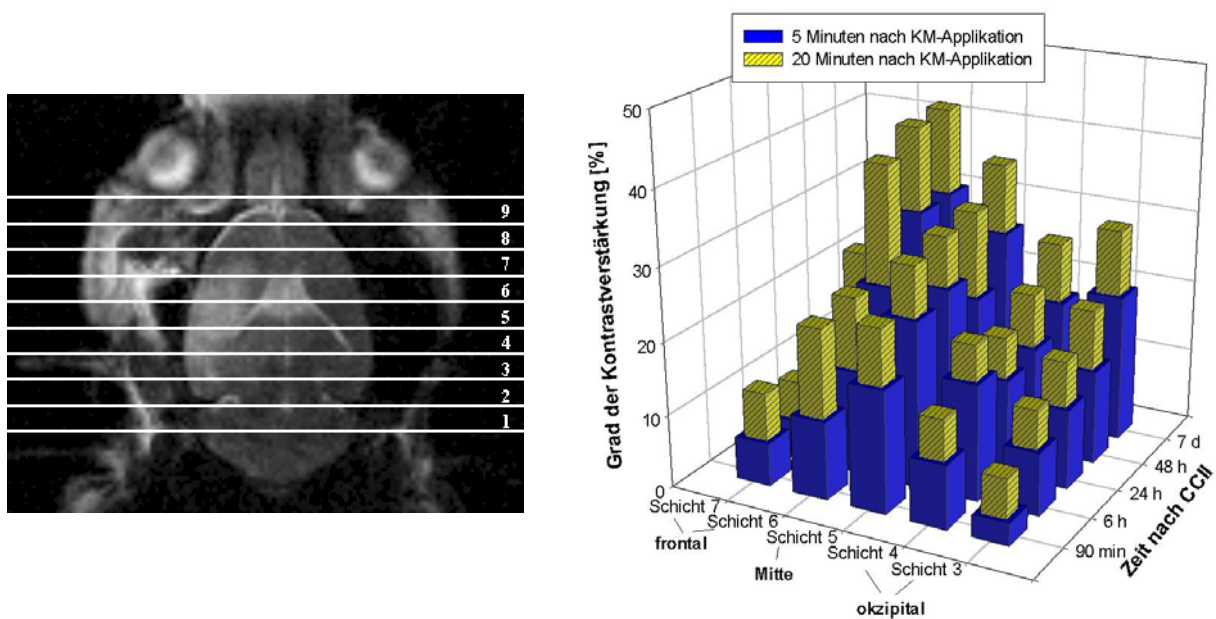


Abb. 4.4: Grad der Kontrastverstärkung des Läsionszentrums in den Schichten 3-7

Im Vergleich dazu zeigten die in Stoßrichtung gelegenen Meßpunkte der zentralen Schicht 5 folgendes Bild:

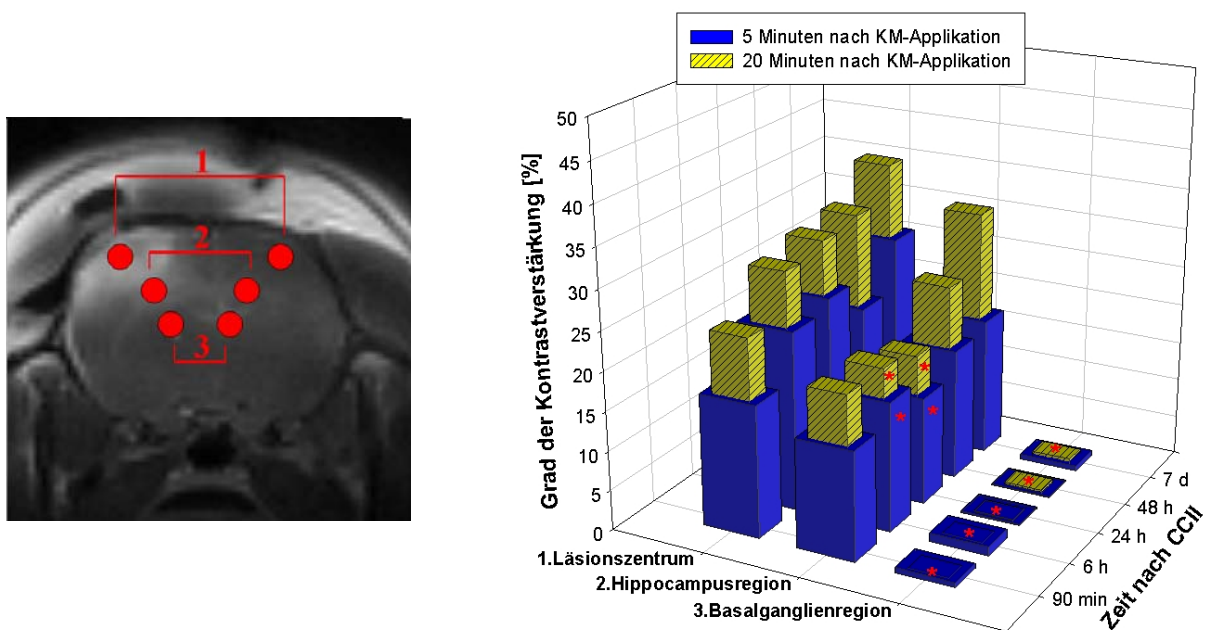


Abb. 4.5: Grad der Kontrastverstärkung des Läsionszentrums im Vergleich mit in Stoßrichtung gelegenen Meßpunkten (Schicht 5)

Der maximale Grad der Kontrastverstärkung lag in der peripheren Ödemzone bzw. Hippocampusregion nur zu den Zeitpunkten 6 und 24 Stunden nach CCII signifikant ($p < 0,05$) niedriger als im Läsionszentrum. Die Basalganglienregion wies zu allen Zeitpunkten eine

signifikant ($p < 0,05$) geringere Kontrastverstärkung als das Läsionszentrum und die periphere Ödemzone auf (s. Abb. 4.5).

Die kortikal gelegenen Meßpunkte wiesen folgende Werte auf:

Während im Läsionszentrum 6 Stunden nach CCII hinsichtlich der Kontrastverstärkung ein Plateau erreicht wurde, wiesen die peripheren Punkte 2 und 3 kontinuierlich ansteigende und bis zu Zeitpunkt von 48 Stunden nach CCII signifikant ($p < 0,05$) niedrigere Werte auf (s. Abb. 4.6). Die Werte des weit entfernten Kortextmeßpunktes lagen zu allen Zeitpunkte signifikant ($p < 0,05$) unter denen des Läsionszentrums und der Ödempерipherie.

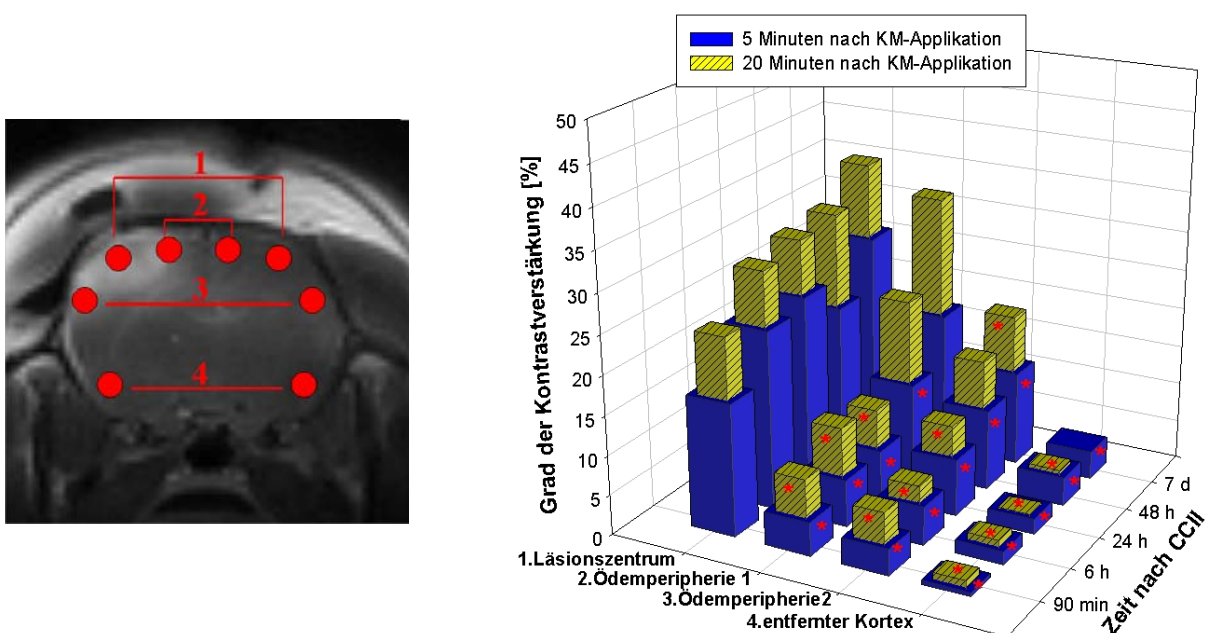


Abb. 4.6: Grad der Kontrastverstärkung des Läsionszentrums im Vergleich mit kortikal gelegenen Meßpunkten (Schicht 5)

4.1.2.2 Ausdehnung der Kontrastmittel-Extravasation

Die Fläche, die nach der Kontrastmittelapplikation durch das Extravasat eingenommen wurde, zeigte für die verschiedenen Bild-Schichten eine unterschiedliche Dynamik (s. Abb. 4.7).

Während in den perifokalen Schichten 3-4 bzw. 6-7 eine relative Größenzunahme der Fläche bis zum Zeitpunkt 24 bzw. 48 Stunden zu verzeichnen war, stellte sich in der zentralen Schicht 5 ein maximales Kontrastmittelextravasationsareal 6 Stunden nach CCII ein. Hier scheint offenbar initial der stärkste Blut-Hirn-Schranken-Schaden vorzuliegen.

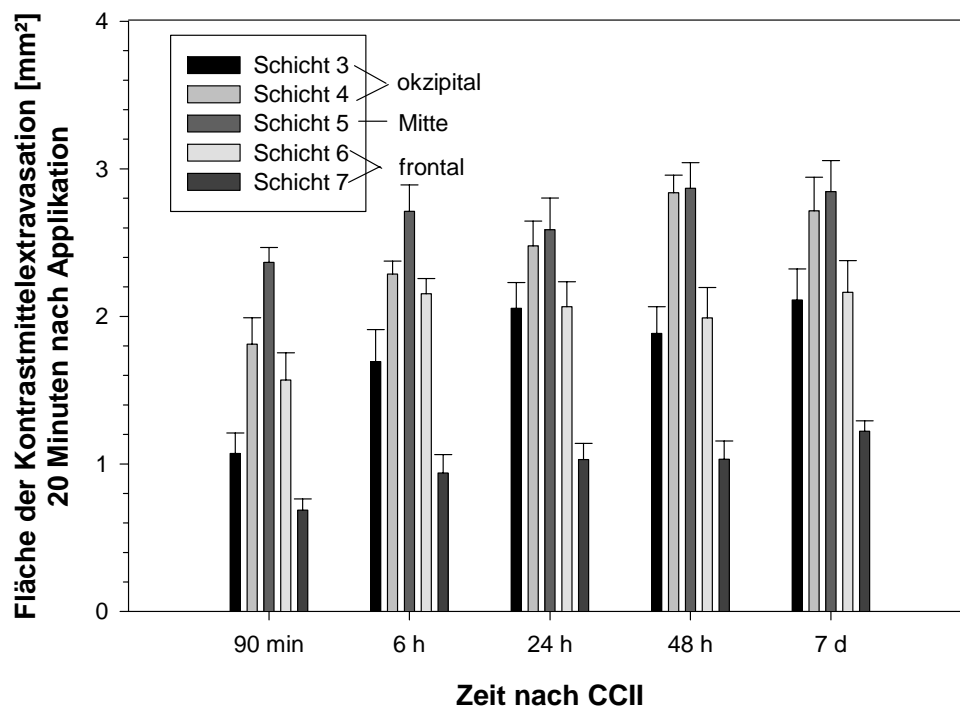


Abb. 4.7: Fläche der Kontrastmittelextravasation in den Schichten 3-7 jeweils 20 Minuten nach KM-Applikation zu den verschiedenen Meßzeitpunkten nach CCII

4.2 Therapie des posttraumatischen Hirnödems mit LF 16.0687 Ms

4.2.1 Gravimetrische Bestimmung der hemisphäralen Schwellung

Nach einmaliger Injektion von LF 16.0687 MS [3mg/kg KG (n=12)] wurde die hemisphärale Schwellung im Vergleich zu den Kontrolltieren (n=12) 24 Stunden nach CCII signifikant um 26,8 % reduziert. In der höheren Dosierung [30mg/kg KG / (n=14)] zeigte die Substanz keine weitere Reduktion der hemisphäralen Schwellung [27,21 % im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abb. 4.8)].

Einige der Tiere wiesen nach Injektion der hohen Dosis an der Injektionsstelle eine subkutane Nekrose auf.

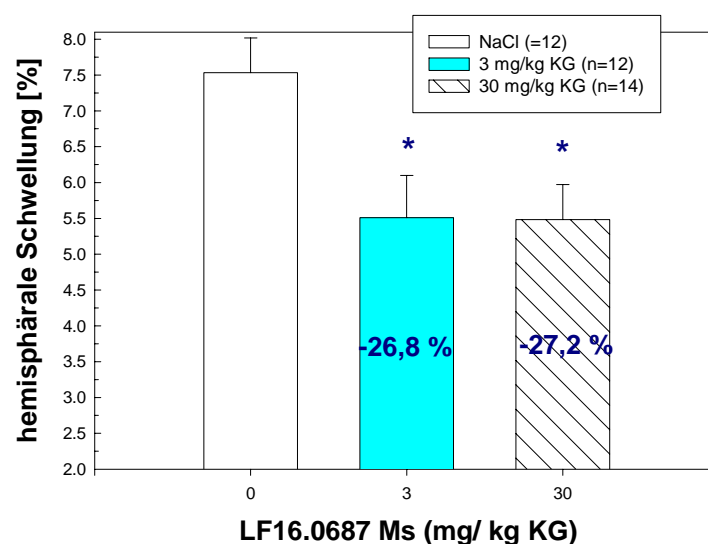


Abb. 4.8: Hemisphärale Schwellung nach Gabe von LF 16.0687 Ms

4.2.2 Zerebraler Wassergehalt

Der Unterschied hinsichtlich des Wassergehaltes zwischen traumatisierter und nicht-traumatisierter Hemisphäre ist sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den mit LF 16.0687 Ms therapierten Tieren signifikant ($p < 0,05$). Der Wassergehalt der traumatisierten Hemisphäre wurde durch Gabe von LF 16.0687 Ms in beiden Dosierungen im Vergleich zu den Kontrolltieren nichtsignifikant reduziert. In der nicht-traumatisierten Hemisphäre fielen die tendenziell erhöhten Werte der mit LF 16.0687 Ms therapierten im Vergleich zu den Kontrolltieren auf (s. Abb. 4.9).

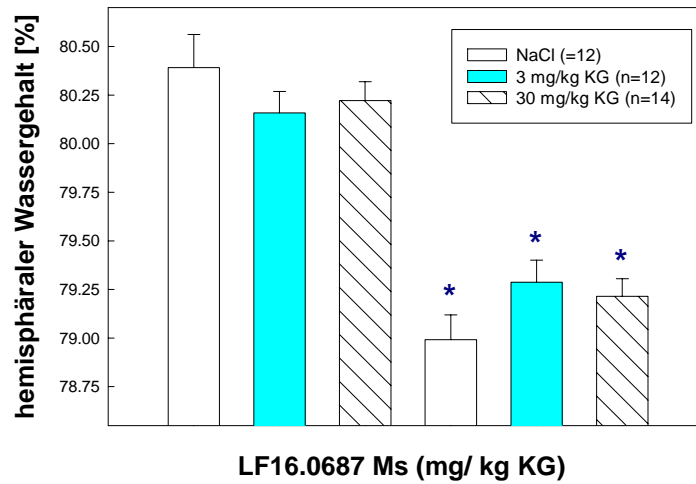


Abb. 4.9: Wassergehalt der traumatisierten und nicht-traumatisierten Hemisphäre

Die errechnete Differenz zwischen den beiden Hemisphären war nach Gabe von LF 16.0687 Ms in beiden Dosierungen [(0,87 ± 0,11 %) bzw. (1,01 ± 0,10 %)] im Vergleich zu den Kontrolltieren (1,4 ± 0,13 %) Tieren allerdings signifikant reduziert (s. Abb. 4.10).

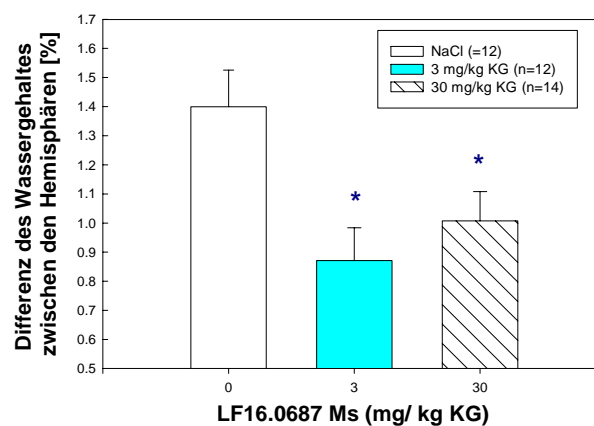


Abb. 4.10: Interhemisphäreale Differenz des Wassergehaltes

4.2.3 Physiologische Parameter

4.2.3.1 Mittlerer Arterieller Blutdruck (MABP)

Der MABP wurde vor Induktion der kortikalen Kontusion alle 10 Minuten, posttraumatisch und vor Hirnentnahme im 1- bzw. 5- minütigen Abstand protokolliert. In der nachfolgenden Tabelle sind die gemittelten Blutdruckwerte vor Trauma, 20 Minuten nach Injektion von LF 16.0687 Ms oder 0,9 % NaCl und vor der Hirnentnahme für jede Gruppe wiedergegeben:

Mittlerer arterieller Blutdruck [mmHg]:

	Vor Trauma	20 min nach Injektion	Vor Hirnentnahme
Kontrollgruppe (n=12)	87 ± 7	84 ± 2	87 ± 5
LF 16.0687 Ms 3mg/kg KG (n=12)	86 ± 6	86 ± 3	84 ± 5
LF 16.0687 Ms 30mg/kg KG (n=14)	87 ± 6	85 ± 4	85 ± 6

Tab. 4.1: Mittlerer arterieller Blutdruck

Wie aus der obenstehenden Tabelle ersichtlich, beeinflusste die Substanz in den gewählten Dosierungen (3mg/kg und 30mg/kg KG) den MABP 20 Minuten nach der Substanzgabe nicht.

4.2.3.2 Intrakranieller Druck (ICP) und Zerebraler Perfusionsdruck (CPP)

Der intrakranielle Druck (ICP) wurde kurz vor der Hirnentnahme über ein Zeitintervall von fünf Minuten erhoben. Die gleichzeitige Messung des MABP erlaubte so die Berechnung des zerebralen Perfusionsdruckes (CPP).

Es lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den mit LF 16.0687 MS therapierten Tieren vor (s. Tab.4.3).

	ICP [mmHg]	CPP [mmHg]
Kontrollgruppe (n=12)	11 ± 1	74 ± 1
LF 16.0687 Ms 3mg/kg KG (n=12)	11 ± 1	74 ± 1
LF 16.0687 Ms 30mg/kg KG (n=14)	13 ± 1	73 ± 2

Tab. 4.2: ICP und CPP

4.2.3.3 Ergebnisse der arteriellen Blutgasanalyse

Die kurz vor der Traumatisierung, 25 Minuten nach CCII (20 Minuten nach Substanzgabe), 5 Stunden nach CCII und vor Hirnentnahme erhobenen Blutgaswerte zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Therapiegruppen (siehe Tab. 4.4 bis 4.6). In fast allen Fällen war der Anstieg des pH und des P_{O_2} wie auch der Abfall des PCO_2 und des Hb 24 Stunden nach CCII im Vergleich zu vor oder kurz nach CCII signifikant ($p < 0,05$).

Kontrollgruppe (n=12):

	Vor Trauma	25 min nach Trauma	5h nach Trauma	Vor Hirnentnahme
PH	$7,41 \pm 0,02$	$7,37 \pm 0,01$	$7,41 \pm 0,06$	$7,48 \pm 0,01$ (*)
PCO₂	$41,55 \pm 3,83$	$45,03 \pm 1,59$	$37,90 \pm 6,90$	$32,4 \pm 1,4$ (*)
PO₂	$132,4 \pm 9,3$	$122,5 \pm 6,2$	$144,9 \pm 5,3$	$139,1 \pm 7,7$
SBC	$24,9 \pm 0,5$	$24,4 \pm 0,4$	$23,8 \pm 0,5$	$25,2 \pm 0,4$
Hb	$13 \pm 0,3$	$12,9 \pm 0,3$	$11,8 \pm 0,6$	$11,2 \pm 0,3$ (*)

Tab. 4.3: Blutgase der Kontrollgruppe

LF 16.0687 Ms 3mg/kg KG (n=12):

	Vor Trauma	25 min nach Trauma	5h nach Trauma	Vor Hirnentnahme
PH	$7,40 \pm 0,01$	$7,39 \pm 0,01$	$7,44 \pm 0,01$	$7,48 \pm 0,01$ (*)
PCO₂	$37,71 \pm 1,50$	$39,03 \pm 1,44$	$33,40 \pm 1,12$	$33,28 \pm 1,38$ (*)
PO₂	$149,7 \pm 9,4$	$118 \pm 8,4$	$180 \pm 11,9$ (*)	$154,8 \pm 7,2$
SBC	$23,4 \pm 0,5$	$23,4 \pm 0,7$	$23,6 \pm 0,4$	$26 \pm 0,6$ (*)
Hb	$12,1 \pm 0,2$	$12,6 \pm 0,5$	$11,2 \pm 0,4$	$10,6 \pm 0,4$ (*)

Tab. 4.4: Blutgase (Dosis : 3mg/kg KG)

LF 16.0687 Ms 30mg/kg KG (n=14):

	Vor Trauma	25 min nach Trauma	5h nach Trauma	Vor Hirnentnahme
PH	$7,43 \pm 0,01$	$7,37 \pm 0,02$	$7,45 \pm 0,01$	$7,48 \pm 0,01$ (*)
PCO₂	$36,17 \pm 1,86$	$39,11 \pm 3,09$	$33,25 \pm 1,05$	$32,13 \pm 1,04$
PO₂	$118,8 \pm 11,3$	$125,4 \pm 11,4$	$167,2 \pm 10,5$	$140,1 \pm 8$
SBC	$24,1 \pm 0,6$	$22,2 \pm 0,8$	$24,0 \pm 0,4$	$25,4 \pm 0,4$ (*)
Hb	$13 \pm 0,4$	$12,2 \pm 0,4$	$11,5 \pm 0,3$	$10,9 \pm 0,2$ (*)

Tab. 4.5: Blutgase (Dosis : 30mg/kg KG)

4.2.3.4 Posttraumatische Gewichtsentwicklung

Die Tiere hatten vor Trauma ein Gewicht von 328 ± 8 g. Sie verloren innerhalb von 24 Stunden im Mittel 7,3 % ihres Ausgangsgewichtes. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bestand nicht.

4.3 Magnetresonanztomographische Quantifizierung der Wirkung von LF 16.0687 Ms

4.3.1 T2-gewichtete Aufnahmen

Jeweils 5 Kontrolltiere (NaCl) und 5 mit LF 16.0687 Ms therapierte Tiere (3mg/kg KG) wurden zu den Zeitpunkten 6 und 24 Stunden nach Trauma mittels MRT untersucht. Der Anteil der interhemisphären Differenz an der nicht-traumatisierten Hemisphäre zeigte, daß die Schwellungswerte der mit LF 16.0687 Ms therapierten Tiere zu den gewählten Zeitpunkten 6 und 24 Stunden nahezu denen der Kontrolltiere entsprachen. [Der Zuwachs des hemisphären Schwellungswertes war bei den NaCl-Tieren von 6 auf 24 Stunden signifikant ($p < 0,05$), bei den therapierten Tieren nicht (s. Abb. 4.11).]

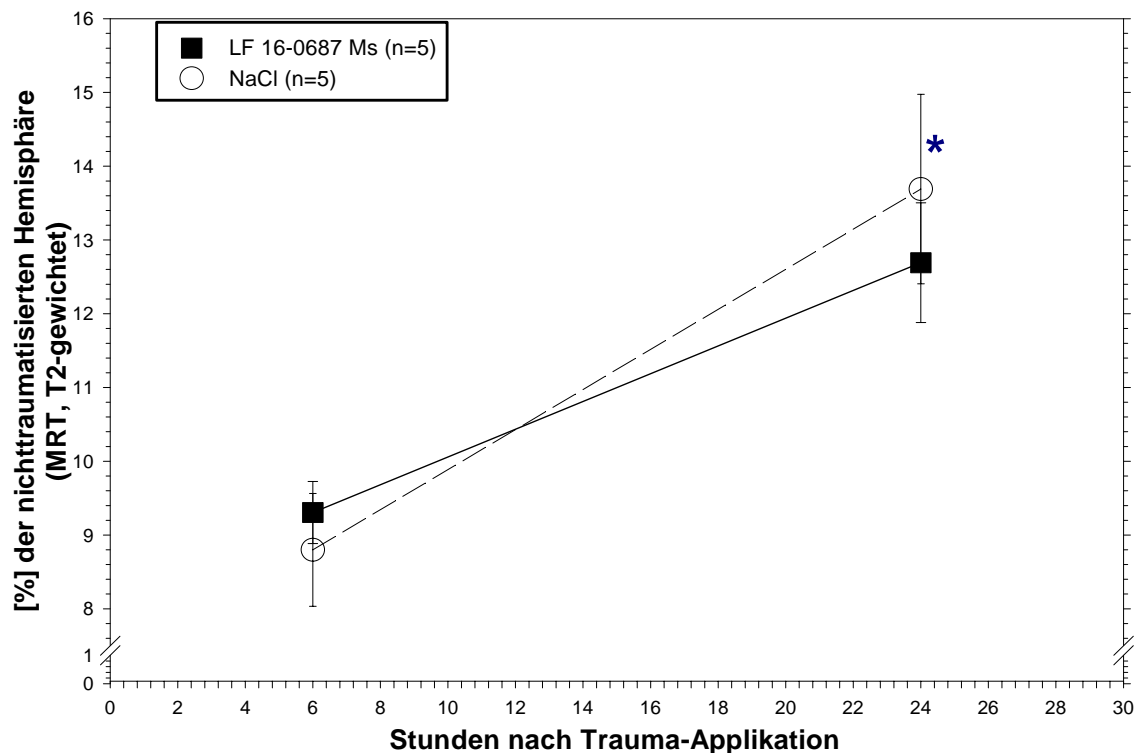


Abb. 4.11: Volumendifferenz zwischen traumatisierter und nicht-traumatisierter Hemisphäre (in Prozent der nicht-traumatisierten Hemisphäre) in T2-gewichteter Bildgebung

4.3.2 T1-gewichtete Aufnahmen mit Kontrastmittelanwendung

4.3.2.1 Grad der Kontrastverstärkung

Native Bildgebung

Diejenigen Kontrolltiere, denen das Kontrastmittel 90 Minuten, 6 und 24 Stunden nach CCII 90 Minuten nach Trauma injiziert wurde, zeigten eine deutliche und zum Teil signifikante Zunahme der Kontrastverstärkung im Vergleich zu den Kontrolltieren, die das Kontrastmittel nur 6 und 24 Stunden nach Trauma bekommen hatten. Dies könnte auf eine Retention des extravasierten Kontrastmittels Gadolinium-DTPA hindeuten (s. Abb. 4.12):

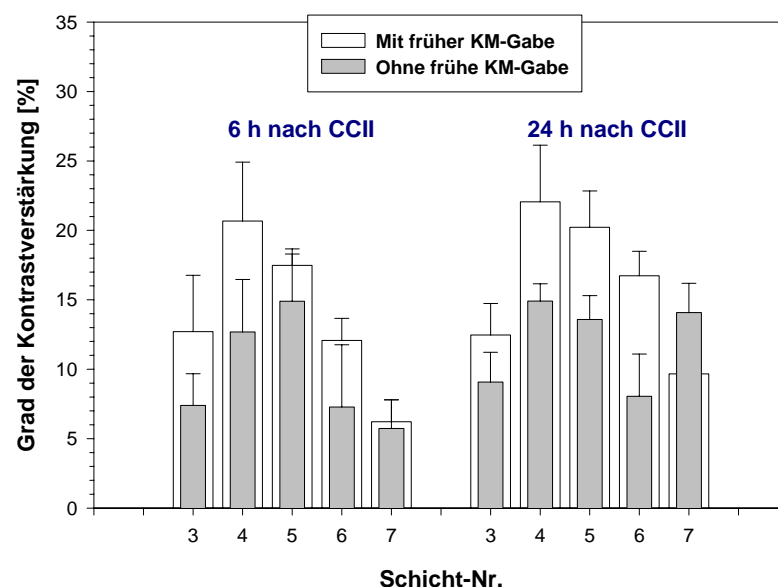


Abb. 4.12: Grad der Kontrastverstärkung in der Kontusion mit und ohne frühe KM-Applikation (90 min nach CCII)

Post-Kontrast-Bildgebung

Die T1-gewichteten Aufnahmen nach Kontrastmittelgabe gaben Aufschluß über die Differenz der Kontrastmittelextravasation zwischen der traumatisierten und der nicht-traumatisierten Hemisphäre.

Während es bei den Kontrolltieren zu einem signifikanten Zuwachs der Kontrastverstärkung von 6 auf 24 Stunden nach CCII kam ($p < 0,05$), war diese Zunahme bei

den LF 16.0687 Ms therapierten Tieren nicht signifikant. Nach 24 Stunden lag der Grad der Kontrastverstärkung bei diesen Tieren allerdings tendenziell niedriger als bei den Kontrolltieren. Zwischen den Gruppen zeigte sich zu beiden Zeitpunkten kein signifikanter Unterschied (s. Abb. 4.13).

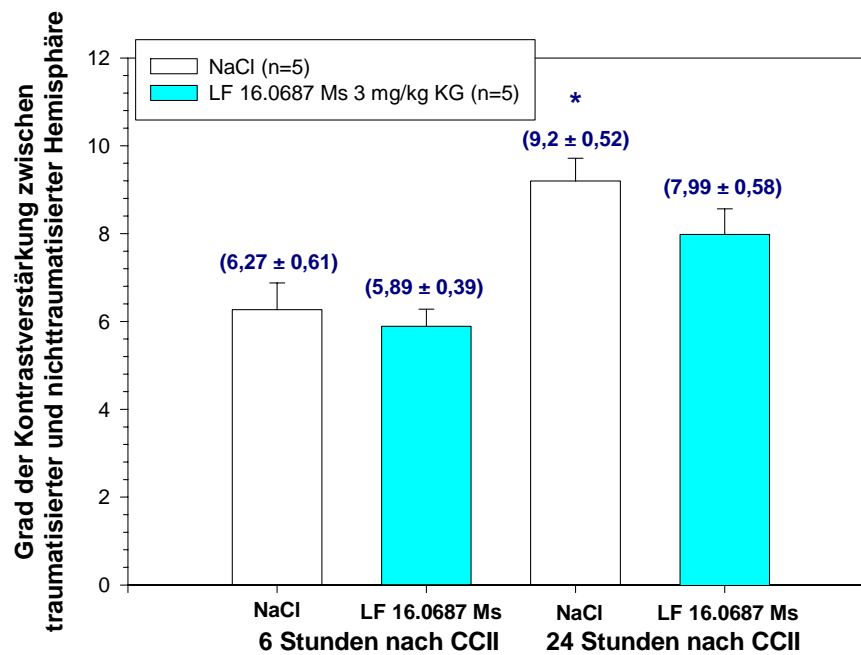


Abb. 4.13: Grad der Kontrastverstärkung zwischen traumatisierter und nicht-traumatisierter Hemisphäre 20 Minuten nach Kontrastmittelapplikation

4.3.2.2 Fläche der Kontrastmittelextravasation

Die Fläche der Kontrastmittelextravasation wurde 5 Minuten nach KM-Applikation auf die gleiche Weise wie in Abschnitt 4.1.2.2 beschrieben, bestimmt.

Bei den Kontrolltieren war die gleiche Tendenz zu beobachten, wie sie auch in dem dynamischen Zeitprofil der Kontrastmittelextravasation über 7 Tage ermittelt wurde (s. Kap. 4.1.2.2, Abb. 4.7).

Die Schichten, die entfernter vom Kontusionszentrum waren (3-4, bzw. 6-7), wiesen auch hier eine andere Dynamik auf als die kontusionszentrale Schicht 5.

Die mit dem Bradykininrezeptorantagonisten therapierten Tiere zeigten zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine signifikante Reduktion der Kontrastmittelextravasation verglichen mit den Kontrolltieren.

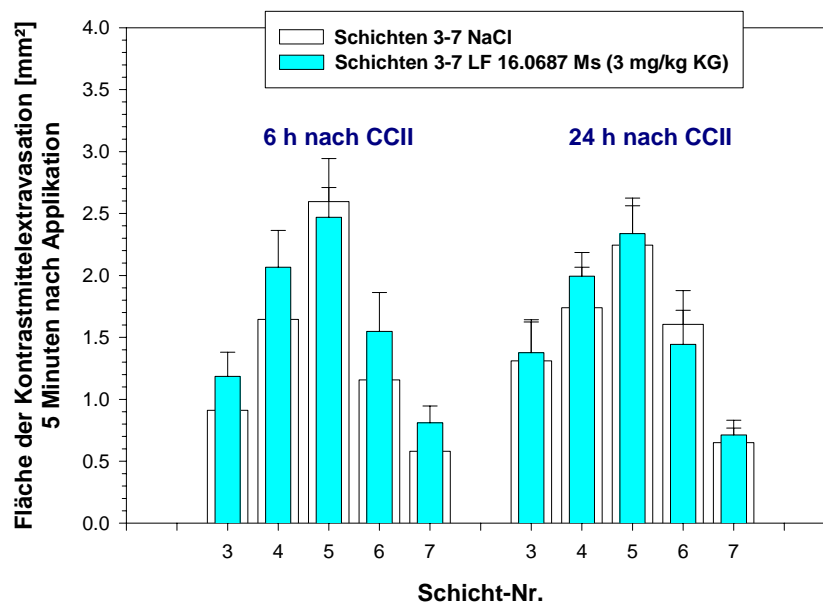


Abb. 4.14: Fläche der Kontrastmittelextravasation 5 Minuten nach KM-Applikation (NaCl und LF 16.0687 Ms im Vergleich)

4.3.3 Gravimetrische Bestimmung der hemisphären Schwellung

Bei den Tieren, die magnetresonanztomographisch mit anschließender Gravimetrie untersucht wurden, zeigten sich insgesamt signifikant höhere hemisphärele Schwellungswerte als bei den Tieren, deren hemisphärele Schwellungswerte nicht zusätzlich im MRT sondern nur durch Gravimetrie gemessen wurden. Der Schwellungswert lag in der Kontrollgruppe bei ($11,21 \pm 2,55$ %) und nach Gabe von LF 16.0687 Ms ($10,58 \pm 1,19$ %) (s. Abb. 4.15).

Im Vergleich zu den Tieren, bei denen die hemisphärele Schwellung anhand des Feucht-Trocken-Gewichtes quantifiziert wurde, war der hemisphärele Schwellungswert der Tiere, die zusätzlich magnetresonanztomographischen Methoden unterzogen wurden, signifikant größer (ca. 49 %). Die zuvor festgestellte antiödematöse Wirkung von LF 16.0687 Ms war in der MRT-Serie nicht so prononciert [(Kontrolle: ($7,53 \pm 0,49$) % / LF 16.0687 Ms : ($5,51 \pm 0,59$) %)].

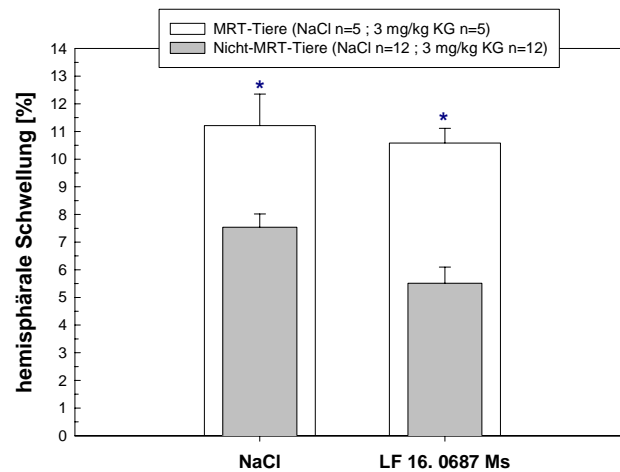


Abb. 4.15: Hemisphäreale Schwellung nach NaCl und LF 16.0687 Ms-Gabe der gravimetrisch und zusätzlich magnetresonanztomographisch untersuchten Tiere

4.3.4 Korrelation zwischen Magnetresonanztomographie und Gravimetrie

Die Regression zwischen den 24 Stunden nach Traumatisierung gravimetrisch und magnetresonanztomographisch ermittelten Werten der hemisphären Schwellung ergab eine Korrelation mit einem Spearman'schen Koeffizienten von 0,87 (s. Abb. 4.16).

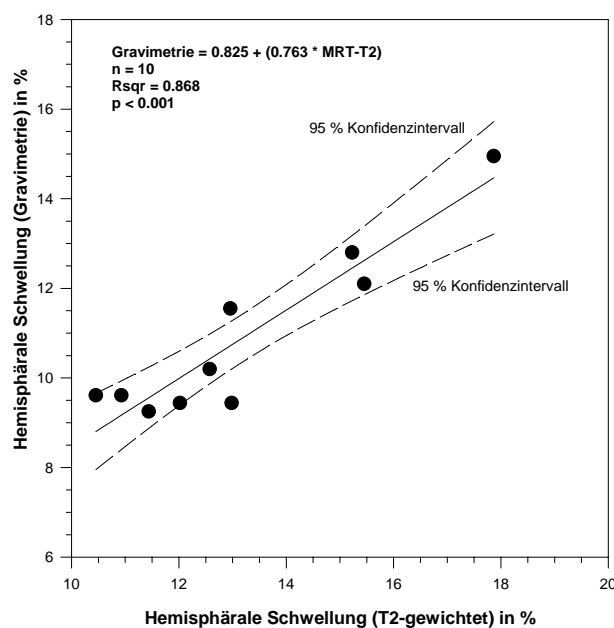


Abb. 4.16: Regression zwischen gravimetrisch und magnetresonanztomographisch bestimmter hemisphärer Schwellung

4.3.5 Gravimetrische Bestimmung des zerebralen Wassergehaltes

Auch bei den im MRT untersuchten Tieren war der Wassergehalt der traumatisierten [Kontrollgruppe: $(81,19 \pm 0,51) \%$; Therapiegruppe: $(81,20 \pm 0,39) \%$] signifikant ($p < 0,05$) höher als der der nicht-traumatisierten Hemisphäre [Kontrollgruppe: $(79,13 \pm 0,31) \%$; Therapiegruppe: $(79,23 \pm 0,31) \%$]. Der Unterschied der traumatisierten Hemisphären der substanztherapierten Tiere und der Kontrollgruppe war nicht signifikant.

Der Wassergehalt der ausschließlich gravimetrisch untersuchten Tiere lag in der traumatisierten Hemisphäre signifikant ($p < 0,05$) niedriger [Kontrollgruppe: $(80,39 \pm 0,17) \%$; Therapiegruppe: $(80,16 \pm 0,11) \%$] als bei den zusätzlich im MRT untersuchten Tieren. In der nicht-traumatisierten Hemisphäre gab es keinen signifikanten Unterschied (s. Abb. 4.17).

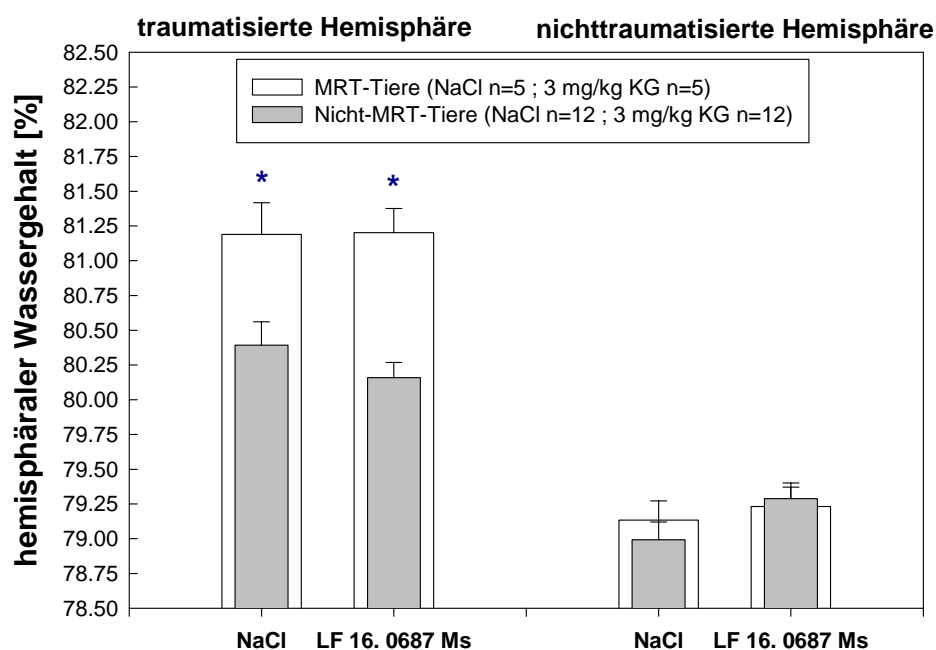


Abb. 4.17: Wassergehalt der traumatisierten und nicht-traumatisierten Hemisphäre nach NaCl und Substanzgabe (MRT-Tiere vs. Nicht-MRT-Tiere)

Die Differenz zwischen den beiden Hemisphären betrug in der Kontrollgruppe $(2,06 \pm 0,38) \%$ und in der Therapiegruppe $(1,97 \pm 0,2) \%$. Bei den Tieren, die nicht den MRT-Methoden unterzogen worden waren, lag diese Differenz bei den Kontrolltieren bei $(1,4 \pm 0,13) \%$ und den Substanztieren bei $(0,87 \pm 0,11) \%$. Beide Werte lagen signifikant unter denen der MRT-Tiere (s. Abb. 4.18).

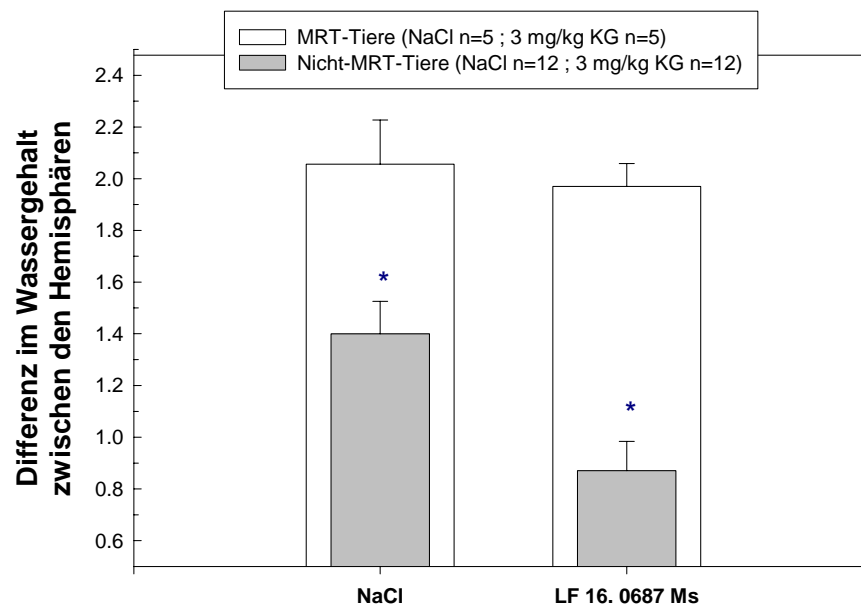


Abb. 4.18: Interhemisphärele Differenz des Wassergehaltes (MRT-Tiere vs. Nicht-MRT-Tiere)

4.3.6 Posttraumatische Gewichtsabnahme

Die Tiere der Kontrollgruppe hatten im Mittel nach 24 Stunden 9,1 % ihres Ausgangsgewichtes verloren. Die mit LF 16.0687 Ms therapierten Tiere im Mittel 9,8 %. Im Vergleich dazu hatten die nur gravimetrischen Methoden unterzogenen Tiere bei einem hemisphäralen Schwellungswert von $(7,53 \pm 0,48)$ % 24 Stunden nach CCII im Mittel 7,3 % (signifikant weniger; $p < 0,05$) verloren.

5. Diskussion

5.1 Anmerkungen zu Material und Methodik

5.1.1 Wahl des experimentellen kortikalen Kontusionsmodells

Zur Erzeugung eines experimentellen Schädel-Hirn-Traumas existieren verschiedene Modelle, die in der Vergangenheit zur Erforschung der Mechanismen des posttraumatischen Hirnödems herangezogen wurden.

Im häufig verwendeten Fluid Percussion-Modell wird durch Injektion einer variablen Flüssigkeitsmenge unter einem variablen Druck in die kraniotomierte Schädelhöhle ein transients Anstieg des intrakraniellen Druckes erzeugt (Dixon et al., 1987). Im Weight Drop-Modell fällt ein Gewicht auf eine auf dem fixierten, geschlossenen Schädel befestigte Stahlplatte, wobei sich die Kontusionskraft diffus über den Schädel verteilt und partiell durch elastische Komponenten des Schädelknochens und der Wirbelsäule abgefangen wird (Marmarou et al., 1994).

Das hier verwendete Controlled Cortical Impact Injury-Modell (CCII) erzeugt vornehmlich eine fokale kortikale Hirnverletzung, während das Fluid Percussion- und das Weight Drop-Modell zu einer diffusen Hirnschädigung führen. Bei dem CCII Modell wird ein druckluftbetriebener Bolzen, dessen Stoßgeschwindigkeit, Impressionstiefe und –dauer fein regulier- und steuerbar sind, auf die freigelegte Gehirnoberfläche beschleunigt, ohne dabei die Dura mater zu verletzen (Dixon et al., 1991; Lighthall, 1988). Diese Kontusion ist verbunden mit einer signifikanten Schwellung der kontusionierten Hemisphäre mit intraparenchymaler, subduraler und subarachnoidaler Hämorrhagie, die sich im weiteren Verlauf in eine nekrotische Kavität umwandelt. Das entstehende Hirnödem setzt sich sowohl aus vasogenen als auch aus zytotoxischen Anteilen zusammen, wobei die vasogene Komponente geringer ausfällt als im Kälteläsionsmodell Klatzos (Unterberg et al., 1997; Klatzo et al., 1987; Unterberg et al., 1997). Bei diesem Modell wird mit einem auf $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlten Kupferstempel eine fokale kortikale Kälteläsion erzeugt, die von einem perifokalen Hirnödem umgeben ist (Klatzo et al., 1987).

Ferner kommt es im CCII-Modell zu einer sekundären Zunahme von Kontusion und Ödem, einer langanhaltenden Erhöhung von Glutamat, $\text{TNF-}\alpha$ und IL-6 im Liquor sowie zu einer Abnahme der kortikalen Perfusion (s.u.) und zu metabolischen und energetischen

Veränderungen (Stroop et al., 1998; Stover et al., 2000a; Kroppenstedt et al., 2000; Sutton et al., 1994). Der in der vorliegenden Studie vorhandene läsionsgrößenabhängige Gewichtsverlust 24 Stunden nach CCII [7,3% des Ausgangsgewichtes bei einer hemisphäralen Schwellung von $(7,53 \pm 0,48) \%$, 9,1 % bei einer hemisphäralen Schwellung von $(11,21 \pm 2,55 \%)$] steht im Einklang mit Beobachtungen bei Mäusen 24 Stunden nach Trauma. Diese hatten ebenfalls ca. 8 % ihres Ausgangsgewichtes verloren und bei doppelter Traumastärke ca. 10 % (Hannay et al., 1999).

Trotz der realitätsnahen Nachstellung und seines mechanischen Prinzips mit standartisiertem morphologischen Korrelat, durch das das CCII-Modell den anderen Modellen überlegen ist, kann die uneinheitliche Krankheitsentität des menschlichen Schädel-Hirn-Traumas auch durch dieses Modell nicht perfekt simuliert werden.

5.1.2 Wahl der Versuchstiere

Ratten verfügen über weitgehend bekannte physiologische, pathophysiologische neurochemische und molekularbiologische Abläufe im Vergleich zu höheren Spezies (z.B. dem Menschen). Des weiteren zeichnen sie sich gegenüber anderen Tierspezies durch eine höhere immunologische Stabilität und geringere Streßanfälligkeit aus. Physiologische, pathologische und Regenerationsprozesse laufen im Rattenorganismus sehr viel schneller ab und lassen sich so in kürzerer Zeit beobachten. Viele neuropharmakologische Untersuchungen und Traumamodelle sind bislang vornehmlich bei der Ratte etabliert.

Die Narkoseführung gestaltet sich bei Ratten verglichen mit größeren Tieren genauso wie der übrige apparative Aufwand einfacher. Ferner sind Ratten leichter stereotaktisch zu fixieren und exakter im MR-Tomographen zu positionieren als größere Tiere.

Interindividuelle Unterschiede von Tieren gleichen Alters und die Mengen der zu applizierenden Substanzen sind geringer. Ebenso sind die Beschaffungs- und Unterhaltskosten bei Ratten relativ niedrig.

Problematisch ist hingegen das kleine Hirnvolumen, bei dem sich im Rahmen der gravimetrischen Bestimmung der hemisphäralen Schwellung ein geringer Trennungsfehler stärker auswirken kann.

5.1.3 Effekt von osteoplastischer Trepanation und Inhalationsnarkose

Bei den zusätzlich magnetresonanztomographisch untersuchten Tieren kam es im Vergleich zu den rein gravimetrischen untersuchten Tieren bei völlig identischem Vorgehen hinsichtlich der Kraniektomie und Traumatisierung zu einer 49%-igen (7,53 auf 11,2 %) Steigerung der hemisphäralen Schwellung und zu einer Minderung der antiödematösen Wirkung des Bradykinin-B₂-Rezeptor-Antagonisten LF 16.0687 Ms (3 mg/kg KG) auf die hemisphärale Schwellung. Der hemisphärale Wassergehalt der traumatisierten Hemisphäre steigerte sich bei diesen Tieren um 1% bei fehlender Veränderung in der nicht-traumatisierten Hemisphäre.

Ein Unterschied zwischen diesen Gruppen bestand darin, daß der bei der Kraniektomie entstandene Knochendeckel im Rahmen der MRT-Untersuchungen mittels Zahnzement wieder eingesetzt wurde. Damit wurde konnte eine besseren Kontrastierung der Läsion gegenüber dem der freigelegten Dura mater aufliegenden Weichteilgewebe erzielt werden. In neueren Untersuchungen an Mäusen konnte gezeigt werden, dass das Wiedereinsetzen des zuvor entnommenen Knochendeckels direkt nach CCII zu einer 40%igen Zunahme der Läsionsgröße führte (Zweckenberger et al., 2003).

Zum anderen wurden die im MRT untersuchten Tiere länger narkotisiert. Alle Tiere wurden spontanatmend mit Isofluran und N₂O narkotisiert. Sie wiesen in der arteriellen Blutgaskontrolle eine sehr gute Oxygenierung sowie eine Normokapnie auf, so daß auf eine Intubationsnarkose verzichtet werden konnte.

Neben den Vorteilen der leichten Steuerbarkeit und schnellen Beendigung der Inhalationsnarkose mit Isofluran, sind auch nachteilige Veränderungen unter der Narkose mit volatilen Anästhetika (Halotan und Isofluran) beschrieben.

Isofluran besitzt bei nicht-traumatisierten Tieren kein neutrales zerebrovaskuläres Wirkungsspektrum. Es bewirkt eine zerebrale Vasodilatation, die mit einer Zunahme des zerebralen Blutflusses (CBF), der CO₂-Reaktivität und des intrakraniellen Druckes (ICP) einhergeht (Todd et al., 1996; Lee et al., 1995; Kaieda et al., 1989). Zudem wird der zerebrale Stoffwechsel gesenkt und die Kopplung zwischen Stoffwechsel und CBF aufgehoben (Michenfelder, 1980; Murr et al., 1990).

Nach Trauma führt eine längere Narkose mit Isofluran zu einer z.T. reversiblen Erhöhung des zerebralen Wassergehaltes in der traumatisierten, als auch in der nicht-traumatisierten Hemisphäre (Stover et al., 2000b). Ferner zeigte Isofluran im Kälteläsionsmodell in weiter

vom Focus entfernten Bereichen der traumatisierten Hemisphäre eine sekundäre, ca. 3 Stunden andauernde Hyperämie im Vergleich zur Kontrollgruppe (Murr et al., 1990).

Auch N₂O löst eine Zunahme des zerebralen Wassergehaltes der traumatisierten und der nicht-traumatisierten Hemisphäre aus (Smith et al., 1976).

5.2 Entwicklung des posttraumatischen Hirnödems

Das infolge einer fokalen Kontusion entstehende Hirnödem stellt einen zum Teil reversiblen funktionellen Schaden dar und setzt sich aus verschiedenen Komponenten zusammen, die eine unterschiedliche Dynamik und Ausprägung zeigen. Diese Veränderungen können beim CCII-Modell und bei anderen Traumamodellen beobachtet werden.

Eine Komponente ist der Primärinsult (irreversibler Substanzdefekt), der sich zuerst als Nekrosezone demarkiert [Kälteläsionsmodell (Eriskat et al., 1994)] und sich im zeitlichen Verlauf dann in eine nekrotische Kavität umwandelt, die glial organisiert wird [Weight Drop-Modell (Feeney et al., 1981)]. Weitere Komponenten sind das vasogene und das zytotoxische Hirnödem, wobei der vasogene Anteil in den Anfängen der Erforschung des posttraumatischen Hirnödems als allein dominierend favorisiert wurde (Reulen et al., 1977).

Barzó berichtete, daß kurz nach Erzeugung eines diffusen Schadens mit dem Weight Drop-Modell das vasogene Ödem anteilig dominiert, 60 Minuten nach Trauma jedoch eine zytotoxische Komponente entsteht, die wiederum 1-2 Wochen lang vornehmlich nachweisbar ist (Barzó et al., 1996), 1997a). Diese Annahme stützte er auf Beobachtungen der magnetresonanztomographisch gemessenen ADC-Werte (Apparent Diffusion Coefficient), welche die zufällige, translationale Bewegung der Wasserstoff-Protonen beschreiben und im Falle des zytotoxischen niedrig und im Falle des vasogenen Hirnödems hoch sind (Ito et al., 1996).

5.2.1 Wachstumsdynamik im zeitlichen Verlauf

Die Wachstumsdynamik des posttraumatischen Hirnödems ist Gegenstand intensiver Forschung und wurde vor allem anhand gravimetrischer Methoden und histologischer Marker wie z.B. Meerrettich-Peroxydase und Evans Blue in Traumamodelle fokaler Läsion und der diffuser Hirnverletzung charakterisiert.

Im CCII-Modell beschrieb Baskaya anhand der Evans Blue-Extravasation eine Ödemformation 2 Stunden nach Trauma an der traumatisierten Stelle und eine nachfolgende Ausbreitung über die gesamte Hemisphäre mit einem Maximum nach 24 Stunden (Baskaya et al., 1997). Der Wassergehalt der traumatisierten Hemisphäre ist folglich nach 24 Stunden maximal und hält sich bis zum Zeitpunkt von 48 Stunden sowohl in der traumatisierten (signifikant) als auch in der nicht-traumatisierten (nichtsignifikant) Hemisphäre auf einem Plateau (Stover et al., 2000c).

Im lateralen Fluid Percussion-Modell zeigte sich, daß der Wassergehalt der traumatisierten Hemisphäre zwischen einer Stunde und sechs Stunden nach Trauma am stärksten zunahm und nach 24 Stunden seinen Maximalwert erreicht hatte (McIntosh et al., 1990).

Im Kälteläsionsmodell wurde tendenziell eine ähnliche Dynamik beobachtet, bei der die hemisphärale Schwellung 12 Stunden nach Trauma bereits am größten und der hemisphärale Wassergehalt erst nach 24 Stunden maximal war (Schneider et al., 1994). Hier war auch ein Anstieg des Wassergehaltes der nicht-traumatisierten Hemisphäre zu beobachten, der nach 24 Stunden am höchsten war.

Im Weight Drop-Modell zeigte sich ein entsprechender Anstieg des Wassergehaltes als Verringerung des spezifischen Gewichtes mit einem Maximum nach 18 bzw. 24 Stunden (Shapira et al., 1988; Van den Brink et al., 1990). Nach 4 bis 7 Tagen wurden wieder Normalwerte erreicht (Shapira et al., 1993). Barzó beschrieb mittels Magnetresonanztomographie einen Anstieg der Wassergehaltes der traumatisierten Hemisphäre nach einer Stunde, der nach 24 Stunden maximal war und dann noch einmal nach 7 Tagen anstieg (Barzó et al., 1997a). Beobachtungen der Ventrikelgröße ergaben im modifizierten Weight Drop-Modell nach einer Stunde die kleinste Größe der Ventrikel, die sich in den ersten drei Tagen stark vergrößerte, nach zwei Wochen wieder Normalgröße erreicht hatte und bis zum 42. Tag wieder zunahm (Hayasaki et al., 1997). Darauf basierend nahmen die Autoren an, daß sich das Ödem nach zwei Wochen aufgelöst hatte und sich dann eine zerebrale Atrophie entwickelt hatte.

Die Werte der hemisphäralen Schwellung, die magnetresonanztomographisch zu den Zeitpunkten 90 min, 6, 24, 48 Stunden und 7 Tage nach CCII gemessen wurden, stehen im Einklang mit Verläufen, die an anderen Modellen und zum Teil anderen Methoden erhoben wurden. So zeigte sich ein rascher Anstieg der hemisphäralen Schwellungswerte bis zum Erreichen des Schwellungsmaximums 24 Stunden nach CCII. Die Zunahmegeschwindigkeit

der hemisphäralen Schwellung war zwischen Trauma und 90 Minuten nach CCII maximal und nahm dann ab. Nach 7 Tagen waren nahezu Ausgangswerte erreicht und die Kontusion stellte sich morphologisch als nekrotische Kavität dar.

Planimetrische Verfahren in der T2-gewichteten Bildgebung machten ferner deutlich, daß die Kontusion mit dem sie umgebenden Ödem innerhalb der traumatisierten Hemisphäre stärker wuchs als die relative Größenzunahme der gesamten Hemisphäre (Abb. 4.2, S. 29).

5.2.2 Rückbildung des perifokalen Hirnödems

Die Rückbildung des perifokalen Hirnödems erfolgt in drei Phasen, deren genaue Mechanismen bislang nicht klar definiert werden konnten.

Parallel zur Ödemformation verläuft die *erste Phase* der Restitution aufgrund von Druckgradienten aus dem Extrazellulärraum in das Ventrikelsystem über den sog. „Bulk Flow“ (Reulen et al., 1977). Die Restitutionsgeschwindigkeit ist hierbei unabhängig von der Molekülgröße der Proteine (Cserr et al., 1977).

Nachdem die Druckgradienten abgefallen sind, finden in der *zweiten Phase* der Resolution des Ödems 24 Stunden nach Trauma verstärkt Diffusionsvorgänge durch den Extrazellulärraum in die subarachnoidale und ventrikuläre zerebrospinale Flüssigkeit statt (Ohata et al., 1992). Die Rückdiffusion großmolekularer (Texas Red-Albumin / MW 66 000 D) und kleinemolekularer Fluoreszenzmarker (Na^+ -Floureszein / MW 376 D) ist hierbei abhängig vom ICP. Bei niedrigem ICP beginnt die Rückdiffusion beider Marker zu einem früheren Zeitpunkt als bei höherem ICP (Wrba et al., 1998). Die Arteriolen und Venolen im Bereich des perifokalen Hirnödems nehmen in der *dritten Phase* der Ödemrückbildung durch Pinozytose die Ödemflüssigkeit auf (Vorbodt et al., 1985; Uhl et al., 1999). Neben diesen Drainageprozessen findet ebenfalls eine Pinozytose der Ödemflüssigkeits-Proteine durch Astrozyten und Mikroglia statt (Klatzo et al., 1980).

5.2.3 Dynamik des Blut-Hirn-Schranken-Schadens und der zerebralen Durchblutung

Die Endothelzellen der Hirngefäße bilden eine kontinuierliche Wand, welche die Penetration wasserlöslicher und potentiell neurotoxischer Substanzen in das zentrale Nervensystem verhindert. Zudem halten sie die Ionenkonzentrationen des extrazellulären

Raums des ZNS und des intravasalen Plasmas gegeneinander aufrecht. Das morphologische Korrelat wird als Blut-Hirn-Schranke (BHS) bezeichnet [zur Übersicht: (Pardridge, 1999)].

Die strukturelle und funktionelle Schädigung der BHS führt posttraumatisch zur Entstehung des vasogenen Hirnödems. Diese Störung kann durch den Übertritt verschiedener Substanzen unterschiedlichen Molekulargewichts vom Plasma in das Gehirngewebe quantifiziert werden. Hierbei werden vornehmlich Evans Blue, Meerrettichperoxidase, Na^+ -Floureszein (MW: 376 D) und die Gadolinium-DTPA-Extravasation verwendet.

Das verabreichte Kontrastmittel Gadolinium-DTPA lag als wasserlöslicher Metall-Salz-Komplex mit einem Molekulargewicht von 550 Dalton vor. Dieses Kontrastmittel überwindet die intakte Blut-Hirn-Schranke nicht, verfügt über eine Plasmahalbwertszeit von ca. 90 Minuten, wird zu 90 % innerhalb von 24 Stunden renal eliminiert und hepatisch zu einem Prozentsatz von 0,02 % der applizierten Dosis pro 24 Stunden abgebaut (Kilgore et al., 1987). Der hohe Wirkungsgrad von Gadolinium als Kontrastmittel wurde durch eine entsprechende Anpassung der Repetitionszeit (TR=500 ms) zusätzlich optimiert.

Der Grad der Kontrastverstärkung zwischen der traumatisierten und nicht-traumatisierten Hemisphäre im T1-Bild hängt von der Stärke der Kontrastmittelextravasation ab. Hierbei erscheint das Kontusion-Ödem-Areal (bzw. evtl. intrakontusionelle Blutungen) durch den Kontrastmittelübertritt heller (hyperintens) als die nicht-traumatisierte Hemisphäre (Barzó et al., 1997b).

Studien, die die Dynamik der Öffnung der BHS frühzeitig nach Trauma und dann im Verlauf untersuchten, differierten zum Teil erheblich in ihren Ergebnissen. So zeigte sich, daß 90 Sekunden nach mildem Trauma noch keine BHS-Störung messbar war, 4 Minuten bis 30 Minuten nach Trauma aber eine Öffnung der BHS stattfand (Nawashiro et al., 1994; Barzó et al., 1996) / Gadolinium-DTPA). Es wurde aber auch schon eine Öffnung der BHS bis 15 Stunden nach Trauma beschrieben (Van den Brink et al., 1994).

Untersuchungen mit Meerrettich-Peroxydase zeigten erstmals eine biphasische Öffnung der BHS, die direkt nach Trauma bis eine Stunde danach und dann wieder nach 24 Stunden stattfindet (Baldwin et al., 1996). Dieses Verhalten wies der ipsilaterale Hippocampus auf, während sich die Öffnung der BHS im Bereich des kontusionierten Kortex in diesen Zeitraum nicht änderte. Eine mit der BHS-Öffnung assoziierte Evans Blue Extravasation hat eine Betonung 4-6 Stunden und 3 Tage nach Trauma im Kortex der traumatisierten Hemisphäre zur Folge (Shapira et al., 1993; Baskaya et al., 1997). Diese zweite Öffnung könnte mit einer

verspäteten Reperfusion oder mit der Einwirkung von Mediatorsubstanzen zusammenhängen. Die erste Öffnung scheint essentiell für die Entstehung des Hirnödems innerhalb der ersten 24 Stunden zu sein. Die zweite Öffnung bewirkt aber keinen weiteren Anstieg des Ödemvolumens (Baskaya et al., 1997).

In der vorliegenden Studie wurde bei einigen Tieren Gadolinium-DTPA zu einem frühen Zeitpunkt von 90 Minuten nach Trauma verabreicht und dann noch jeweils zu den Zeitpunkten 6 und 24 Stunden nach CCII, bei anderen Tieren nur zu den Zeitpunkten 6 und 24 Stunden nach Traumatisierung. Die Unterschiede hinsichtlich der Kontrastmittel-extravasation und der damit verbundenen unterschiedlichen Kontrastverstärkungswerte in der Nativ-T1-Bildgebung unterstützen teilweise die Hypothese der frühen Öffnung und Schließung der BHS. Denn die hohen Kontrastverstärkungswerte in der Nativ-T1-Bildgebung zum Zeitpunkt 6 Stunden nach CCII bei den Tieren mit früher Kontrastmittelinjektion im Vergleich zu Tieren ohne frühe KM-Injektion können aus der Addition verschiedener Effekte resultieren:

Einerseits wächst die Kontusion (bzw. das Ödem) und intrakontusionelle Erythrozyten lysieren. Auf diese Weise wird verstärkt Methämoglobin gebildet, das eine Beschleunigung der T1-Relaxationszeit und damit eine signalintensive Abbildung bewirkt. Dies führt zu einer mittleren Aufhellung der Graustufenwerte (bzw. Anhebung der Signalintensität) der traumatisierten Hemisphäre. Dieser Effekt ist allerdings bei Tieren mit und ohne frühe Kontrastmittelgabe (bei sonst völlig identischem Vorgehen) gleich. Für den Unterschied der Kontrastmittelextravasation bzw. hinsichtlich der Kontrastverstärkungswerte zwischen den beiden Gruppen zu den Zeitpunkten 6 und 24 Stunden nach CCII gibt es unter Berücksichtigung der in der T2-gewichteten Bildgebung ermittelten identischen Wachstumsdynamik der Kontusion beider Gruppen einen anderen Grund: Auch ein Verbleiben des Extravasates im Parenchym könnte dafür verantwortlich sein. Dieser Rückhalt des Kontrastmittels im Parenchym durch Schließen der Blut-Hirn-Schranke wurde schon von Barzò et al. beschrieben (Barzó et al., 1997b). Er schlußfolgerte, daß sich die Blut-Hirn-Schranke etwa 25 bis 30 Minuten nach Trauma wieder schließt, wenn keine nachteiligen Faktoren wie Hypoxie und Hypotension die Öffnung verlängern.

Der Sachverhalt, daß die Injektion von Kontrastmittel 90 Minuten nach CCII zu einem Verbleiben des Kontrastmittels im Parenchym führt, das noch nach 6 und 24 Stunden zu

messen ist, unterstützt die These, daß die Blut-Hirn-Schranke auch noch 90 Minuten nach Trauma teilweise geöffnet ist.

Bekräftigt wird diese Vermutung durch die Größe des Kontrastmittelextravasationsareales. Bei den Tieren, die nur zu den Zeitpunkten 6 und 24 Stunden nach CCII der MRT-Bildgebung unterzogen wurden, zeigte sich in der kontusionszentralen Schicht 5 nach 6 Stunden ein höherer Wert für die Kontrastmittelextravasation als 24 Stunden nach CCII. Die Kontrastmittelextravasation nahm ab bzw. hatte zum Zeitpunkt von 6 Stunden nach CCII schon ein Plateau erreicht (s. Abb. 4.7, S. 33). Gleichzeitig stieg das absolute Kontusions- bzw. Ödemvolumen in der T2-gewichteten Bildgebung noch an (s. Abb. 4.1, S. 29). Diese Beobachtungen könnten durch ein Schließen der Blut-Hirn-Schranke im Zeitraum zwischen 90 und 6 Stunden nach CCII erklärt werden.

Der BHS-Schaden, der sowohl bei fokaler als auch diffuser Hirnverletzung vorliegt (mit einer stärkeren Betonung in der fokalen Verletzung), ist hauptsächlich innerhalb der Kontusion und perikontusionell vorhanden, während die BHS in den übrigen Hirnarealen intakt bleibt (Adelson et al., 1998; Bullock et al., 1990; Vorbrodt et al., 1985). Perikontusionell wurde auch die stärkste Extravasation groß- und kleinmolekularer Proteine, mit einem Maximum zwischen dem dritten und zehnten Tag nach Trauma, gemessen (Todd et al., 1990). Das CCII-Traumamodell produziert eine fokale Ischämie und auch in entfernteren Hirnarealen, wie z.B. dem Thalamus kommt es zu einer CBF-Reduktion. Der zerebrale Blutfluß (CBF) ist innerhalb des Kontusionsareals reduziert (Bryan et al., 1995; Nawashiro et al., 1994). In den perifokalen Randbereichen ist der CBF 30 Minuten nach Trauma erhöht und im Zeitraum von 4 bis 8 Stunden nach CCII ca. 40 % reduziert (Nawashiro et al., 1994; Kroppenstedt et al., 2000). Der CBF der kontralateralen Hemisphäre wird nicht verändert (Bryan et al., 1995).

In der vorliegenden Studie ergab sich bei genauerer Analyse des Kontrastverhaltens läsionszentraler, peripherer und weit entfernter Punkte der traumatisierten und nicht-traumatisierten Hemisphäre ein ähnliches Muster. So ist der BHS-Schaden innerhalb des Läsionszentrums am stärksten und erreicht hinsichtlich der Kontrastverstärkung schon sehr früh ein Plateau durch Verschluß der BHS (in den zentralen Schichten 4-6), während in den peripheren Schichten die Werte bis zum Zeitpunkt von 48 Stunden nach CCII noch ansteigen (s. Abb. 4.4, S. 31). Die BHS scheint peripher länger geöffnet zu sein. Das gleiche Bild mit geringeren Werten als im Läsionszentrum zeigte sich in der Ödemperipherie /

Hippocampusregion (s. Abb. 4.5, S. 31). Die Werte in den weiter entfernten Kortexmeßpunkten und in der Basalganglienregion blieben über alle Zeitpunkte konstant niedrig (s. Abb. 4.5, S. 31 u. Abb. 4.6, S.32).

5.3 Das Mediatorenkonzept des posttraumatischen (vasogenen) Hirnödems

Mediatoren des vasogenen Hirnödems können aus dem nekrobiotischen, kontusionierten oder ischämischen Primärfokus selbst (z.B. Glutamat und Serotonin) oder aus dem intravasalen Kompartiment in das Hirn gelangen (Baethmann et al., 1983, 1978).

Dabei können sie vielfältige Wirkungen ausüben wie z.B. die Verstärkung der Blut-Hirn-Schrankenstörung, eine Beeinträchtigung der zerebralen Mikrozirkulation, Verstärkung der neuronalen und glialen Zellschwellung sowie letztlich auch den damit verbundenen Zelluntergang. Mediatoren können sich in ihrer neurotoxischen Wirkung gegenseitig potenzieren.

So begünstigt **Bradykinin** die weitere Ausbreitung und Aufrechterhaltung des vasogenen Hirnödems durch die Verstärkung der BHS-Permeabilität und arteriellen Dilatation (Wahl et al., 1996).

Glutamat führt über Rezeptoren zu einer gesteigerten Wasser- und Na^+ - Permeabilität der Zellmembranen, die eine Zellschwellung, -nekrose und so eine weitere Ausschüttung von Glutamat zur Folge hat [zur Übersicht: (Kempinski, 2001)].

Bei einer topischen Applikation von **Histamin** durch kortikale Superfusion kam es durch Abnahme des pialen Gefäßwiderstandes zu einer signifikanten Weitstellung der pialen Gefäße, was zu einer Erhöhung des zerebralen Blutflusses, einer Öffnung der BHS und der Entstehung eines vasogenen Ödems führte (Butt et al., 1995) [zur Übersicht: (Schilling et al., 1997)].

Arachidonsäure hatte ebenfalls bei kortikaler Superfusion einen Abfall des transendothelialen Widerstandes und eine konsekutive Aufweitung der Blut-Hirn-Schranke zur Folge. **Freie Fettsäuren** lassen eine Zellschwellung durch Störung des Zellstoffwechsels und somit ein zytotoxisches Ödem entstehen.

Ferner konnte die verstärkte Synthese von **NO** und **freien Radikalen** posttraumatisch nachgewiesen werden, die wie die oben genannten Substanzen die posttraumatischen BHS-Öffnung erhöhen und das entstandene Ödem weiter verstärken (Ikeda et al., 1990) [zur Übersicht: (Wahl et al., 1993)].

Die Rolle der **Prostaglandine** (Pickard, 1981) und **Leukotriene** (Wolfe et al., 1976; Unterberg et al., 1987; Unterberg et al., 1990; Unterberg et al., 1992) wird kontrovers diskutiert. Es konnte weder eine durch Leukotriene verursachte BHS-Öffnung eindeutig nachgewiesen, noch eine Ödemformation nach lokaler Leukotrien-Applikation festgestellt werden. Daraus wurde gefolgert, daß Leukotriene nicht zu den Hirnödem-Mediatoren gezählt werden können.

Serotonin wurde zwar nach der Cold lesion verstärkt freigesetzt, dennoch konnte weder ein kausaler Zusammenhang zwischen der Ausschüttung von Serotonin und der Entstehung des posttraumatischen Hirnödems festgestellt noch dieses durch zusätzliche Applikation verstärkt werden (Pappius et al., 1983) [zur Übersicht: (Wahl et al., 1993)].

5.4 Das Kallikrein-Kinin-System im zentralen Nervensystem

Alle Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems konnten (bei Mensch und Ratte) im zentralen Nervensystem nachgewiesen werden (Bhoola et al., 1992).

Obgleich die genaue physiologische Funktion dieses Systems innerhalb des ZNS noch unbekannt ist, so wird doch angenommen, daß eine intrinsische Funktion des Gewebeskallikreins u.a. ist, Vorläufersubstanzen neuronaler Wachstumsfaktoren zu prozessieren, die wiederum die Einheit der Neurotransmitter und der synaptischen Funktion erhalten. Bradykinin selber nimmt die Rolle eines Modulators und/oder Neurotransmitters ein (Bhoola et al., 1992).

Bradykinin ist eines der stärksten endogen schmerzverstärkenden und proinflammatorisch wirksamen Produkte einer Serie von pathophysiologischen Prozessen, die nach einer Gewebeverletzung des zentralen Nervensystems ablaufen (Walker et al., 1995). Zudem ist seit langem bekannt, daß Bradykinin zu den wichtigsten Mediatorsubstanzen des Hirnödems gehört, die nach einer traumatischen, ischämischen oder entzündlichen Gewebeverletzung entstehen können.

5.4.1 Grundlagen des Kallikrein – Kinin Systems

Die zur Gruppe der Serinproteasen gehörenden **Kallikreine** (Kininogenasen) werden als inaktive Präkallikreine von den Hepatozyten sezerniert. Gewebs- und Plasmakallikreine unterscheiden sich in Molekulargewicht, Substratspezifität, immunologischen Eigenschaften

und dem Kinintyp, den sie produzieren. Durch sog. limitierte Proteolyse bewirken sie die Freisetzung von Kininen aus deren hochmolekularen Vorläufern, den Kininogenen. Physiologische Inhibitoren sind der C₁-Inhibitor, α_2 -Makroglobulin, α_1 -Antitrypsin und AT_{III} (Schachter, 1979).

Die biologisch inerten **Kininogene** werden ebenfalls in den Hepatozyten synthetisiert und als Einzelketten-Glykoproteine in Endothelzellen und neutrophilen Granulozyten gespeichert (Bhoola et al., 1992). Sie werden in sog. **HK** (high molecular weighted Kininogens / 88 - 120 kDa), **LK** (low molecular weighted Kininogens / 50 - 68 kDa) und **T-Kininogen** (Akute-Phase-Protein, nur bei der Ratte vorkommend) unterschieden.

Die HK nehmen vornehmlich im Blut, die LK sowohl im Blut als auch im Gewebe an kaskadierenden Prozessen - wie z.B. der Blutgerinnung und Entzündungsreaktionen - teil. Durch ihre inhibierende Wirkung auf die Cysteinproteasen übernehmen sie aber auch zellschützende Funktionen (Moreau et al., 1986).

Aus LK entsteht durch die Wirkung von Gewebeskallikrein **Kallidin** (Lys-Bradykinin) und aus HK **Bradykinin** [zur Übersicht: (Bhoola et al., 1992) s.a. Abb. 5.1]. LK kann durch die Einwirkung der neutrophilen Elastase und Plasma-Kallikrein auch zu Bradykinin abgebaut werden.

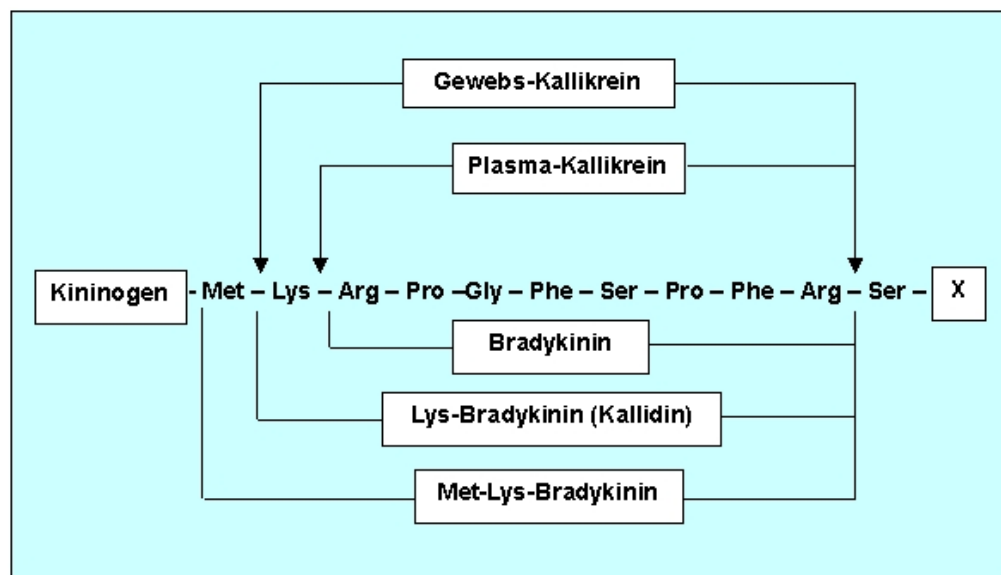


Abb. 5.1: Enzymatisch bedingte Formation der verschiedenen Kinine (modifiziert nach (Bhoola et al., 1992))

Die **Kinine** Kallidin und Bradykinin sind Peptide von gleicher vasoaktiver pharmakologischer Potenz. Lokal freigesetzte Kinine werden durch lokale, frei zirkulierende

und in der Lunge lokalisierte **Kininasen** inaktiviert, was zu der sehr kurzen biologischen Halbwertszeit von 30 Sekunden führt.

Die Wirkung der Kinine wird durch NO und PGE₂, der endothelständigen Kininase und dem endothelständigen Kinin-Rezeptor moduliert.

Auf zellulärer Ebene fördern Kinine den Glukose- und Chloridtransport (ohne Laktatproduktion) und stimulieren die Osteoklastenaktivität (ähnlich den Tachykininen wie z.B. Substanz P, Substanz K und Neuromedin).

Die durch ein Trauma ausgelöste Kinin-Formation findet durch zwei separate Kaskaden im Plasma und Gewebe statt:

Im **Plasma** bindet inaktiver Faktor XII oder Hageman-Faktor an die negativ geladene Oberfläche der freiliegenden Basalmembran. Der so aktivierte Faktor XII bildet das inaktive, an HK gebundene Prekallikrein in Kallikrein um, das wiederum HK zu Bradykinin umwandelt.

Im **Gewebe** ist der Kininvorläufer LK (70 % des Gesamtkinin-Bestandes). Das inaktive Gewebeskallikrein wird hier durch den Gewebeschaden freigesetzte proteolytische Enzyme aktiviert. Die aktive Form liberiert Kallidin aus LK. Bei Ratten wird mehr Bradykinin als Kallidin durch Gewebeschaden freigesetzt (s. Abb. 5.2).

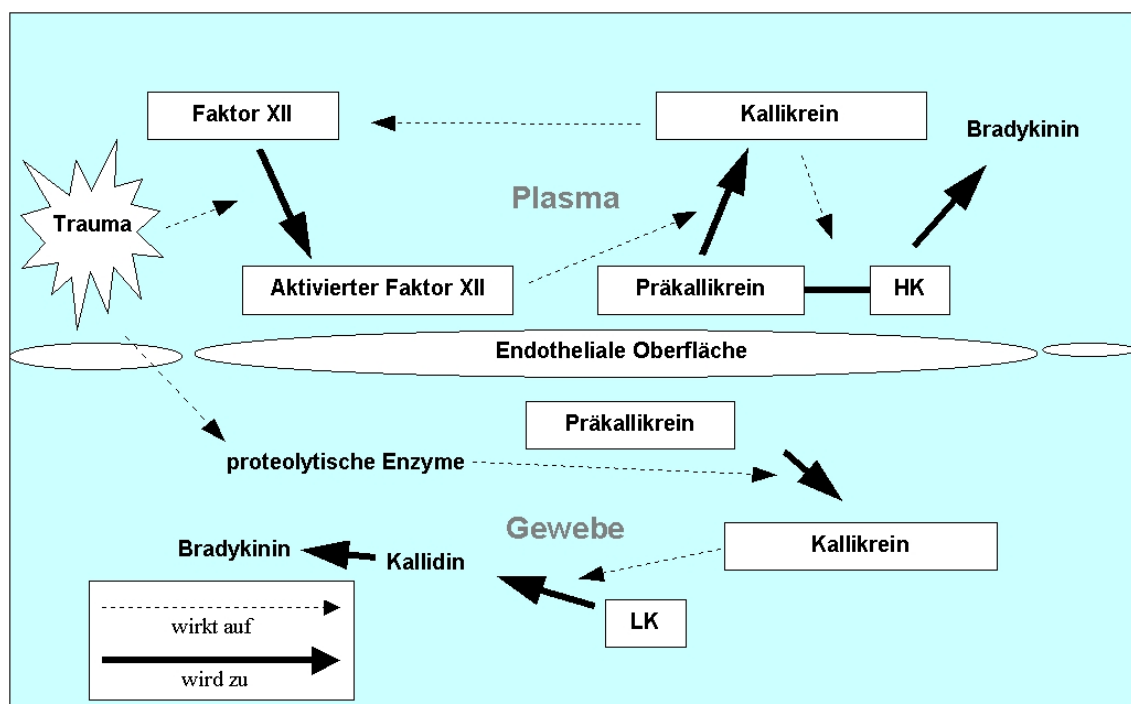


Abb. 5.2: Bildung von Bradykinin im Gewebe und Plasma [modifiziert nach (Walker et al., 1995)]

Der Umsatz der Kinine hängt von der Formationsrate und dem Maß der Inaktivierung durch **Kininasen** (Peptidasen) ab. Diese Enzymgruppe beinhaltet die Kininase-I-Carboxypeptidasen (KI-CPN, KI-CPM) und die Kininase-II-Peptidasen (KII-ACE, KII-NEP).

KI-CPN wird hepatisch synthetisiert, kann sich an Gefäßendothel assoziieren, inaktiviert ca. 90% des frei zirkulierenden Bradykinins durch Hydrolyse und verhindert die Entstehung von NO durch Substrathemmung der NO-Synthetase.

KII-ACE ist im Plasma löslich, aber auch als Gewebeenzym im Gefäßendothel der Lunge (wo es den größten Teil des zirkulierenden Bradykinins bei seiner Lungenpassage inaktiviert), den neuroepithelialen Zellen (Subfornicales Organ, palido-nigrale dendritische Zellen) und in den luminalen Zellen der Plexus choroideus vorhanden. Neben Bradykinin reguliert KII-ACE auch die Konzentration von Enkephalinen, Neurotensinen, Substanz P, ANF und LHRH und wandelt Angiotensin I in Angiotensin II um. Bei Ratten erfolgt die Kininregulation zum größten Teil durch KII-ACE.

Hohe Gesamt-Konzentrationen von Bradykinin wurden in Hypophyse, Rückenmark, Kleinhirn und Kortex (höchste Regional-Konzentration) gefunden (Kariya et al., 1985; Perry et al., 1984). Kallikrein wurde im gesamten ZNS mit besonders hohen Konzentrationen in der Hypophyse und der Epiphyse nachgewiesen (Chao et al., 1987).

5.4.2 Kinin-Rezeptoren: Signaltransduktion und Lokalisation im Zentralen Nervensystem

Die durch Bradykinin hervorgerufenen Effekte werden durch verschiedene Signaltransduktionsprozesse vermittelt, die auf die Aktivierung endothelialer, glialer und neuronaler Kinin-Rezeptoren beruhen. Es sind zwei Kinin-Rezeptoren bekannt:

Der **BK₂-Rezeptor** (constitutive), der bevorzugt Bradykinin und Kallidin bindet und der **BK₁-Rezeptor** (inducible), der Des-Arg-Bradykinin (primäres Bradykinin-Abbauprodukt) bindet (s. Abb. 5.3).

Der BK₂-Rezeptor gehört als integrales rhodopsinähnliches Membranprotein mit sieben transmembranspannenden Regionen zu der Gruppe der „7M-Rezeptoren“, die unter physiologischen Bedingungen bei Seh- und Riechprozessen sowie bei Hormonwirkungen die Signalübertragung gewährleisten [zur Übersicht: (Regoli et al., 1998)].

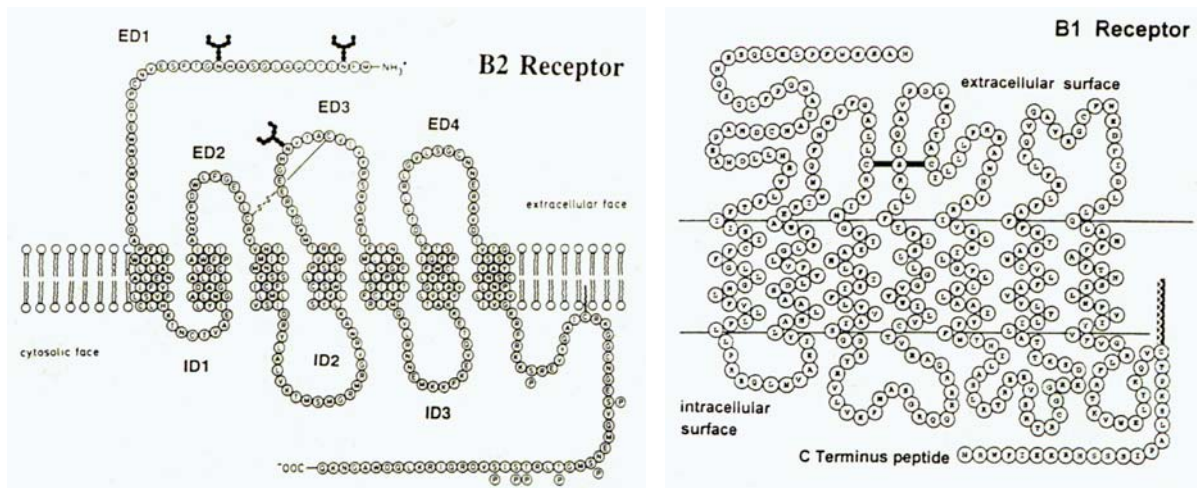


Abb. 5.3: Bradykinin B₂- und B₁-Rezeptoren [aus: (Raidoo et al., 1997)]

Durch ein an den Rezeptor gekoppeltes spezifisches G-Protein (G α und G γ) werden Phospholipase A₂ (Produktion von Prostaglandinen und Leukotrienen) und die Phosphatidyl-Inositol spezifische Phospholipase C aktiviert (Farooqui et al., 1990; Homayoun et al., 1991). Dies wiederum bewirkt die Freisetzung von sekundären Botenstoffen wie Inositoltrisphosphat (IP₃), Diacylglycerol (DAG) und Arachidonsäure (Homayoun et al., 1991; Miller, 1987) (s. Abb. 5.4). Bradykinin induziert die Produktion von IP₃ und DAG sehr schnell (die höchsten Spiegel werden schon Sekunden nach der Applikation erreicht [zur Übersicht: (Francel, 1992)]). Die Folge ist eine verstärkte Lipolyse und eine Erhöhung der Kalziumkonzentration durch Influx und verstärkte Mobilisation aus intrazellulären Kompartimenten wie dem endoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien (Stephens et al., 1993; Doctrow et al., 1994). Kalzium kann aber auch durch die Wirkung von aus IP₃ entstandenem IP₄ über membranständige Kalziumkanäle aus dem Extrazellularraum in die Zelle gelangen [zur Übersicht: (Francel, 1992)]. Dadurch werden die Adenylat- bzw. Guanylat-Zyklase stimuliert und die intrazelluläre Konzentration zyklischer Nukleotide (cAMP, cGMP) steigen an, die ihrerseits z.B. zu einer Erschlaffung der Gefäßmuskulatur führen.

Die Arachidonsäure wird durch die Enzyme Zyklooxygenase und/oder Lipoxygenase zu Prostaglandinen, Leukotrienen und Tromboxanen metabolisiert. Die Prostaglandine (z.B. PGI₂) induzieren ebenfalls eine Vasodilatation [zur Übersicht: (Francel, 1992) und (Walker et al., 1995)].

Auch NO wird durch Stimulation der NO-Synthetase verstärkt synthetisiert und bewirkt eine Vasodilatation über cGMP, dessen Synthese es durch Stimulation der Guanylatzyklase fördert (Ikeda et al., 1994) (s. Abb. 5.4).

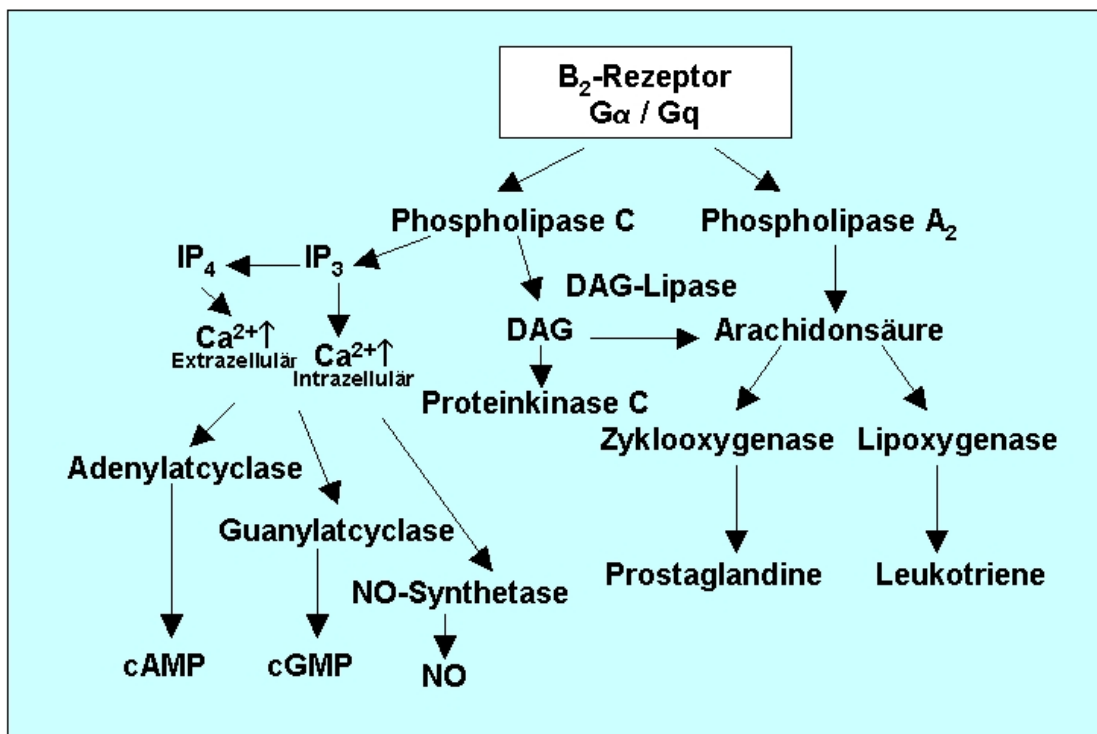


Abb. 5.4: B₂-Rezeptoren gekoppelte Mechanismen

Die Inhibierung der Zyklooxygenase durch Aminosalizylsäure reduzierte die Bradykinin vermittelte Dilatation der pialen Arteriolen (Copeland et al., 1995). Allerdings konnte eine Reduktion des durch Bradykinin vermittelten Hirnödems durch eine Dexamethason-Vorbehandlung und damit verbundene Hemmung der Phospholipase A₂ bei der Katze nicht bewiesen werden (Schürer et al., 1989).

Die Aktivierung der Proteinkinase C könnte z.B. die Endozytose der Endothelzellen und die damit verbundene Ödementstehung stimulieren (Guillot et al., 1990). Ferner bewirken Kinine einen Anstieg von exzitatorischen Aminosäuren wie Glutamat, die z.B. in einem Infarktareal freigesetzt, einen weiteren Zellschaden verursachen (Bhoola et al., 1987). Die molekulare Analyse des BK₁-Rezeptors steht noch aus.

Bei Säugetieren dominieren im zentralen Nervensystem die B₂-Rezeptoren gegenüber den B₁-Rezeptoren (Kariya et al., 1985; Privitera et al., 1991).

Für Ratte und Meerschwein konnten diverse B₂-Bindungsstellen auf kortikalen, Kleinhirn sowie Hirnstamm-Astrozyten (Hösli et al., 1993), in Pons, Rückenmark und verschiedenen Kernen der Medulla oblongata nachgewiesen werden (Cholewinski et al., 1991; Fujiwara et al., 1988).

Die Mehrheit der B₂-Bindungsstellen wurde in diesen Studien auf zerebralen Kapillaren, Neuronen der Trigeminus-Ganglien und im Bereich des Rückenmarks auf den sensorischen C-Fasern gefunden, des weiteren auf Neuronen der dorsalen Wurzel und der Substantia gelatinosa (Homayoun et al., 1991; Davis et al., 1988; Fujiwara et al., 1988).

Bei der Ratte sind B₂-Rezeptoren auch auf kortikalen Oligodendrozyten lokalisiert (Stephens et al., 1993).

Den ersten Nachweis von B₂-Rezeptoren auf humanen Neuronen im Hirnstamm, Basalganglien, Kortex und supraoptischen, tuberalen und paraventriculären Hypothalamuskernen erfolgte durch Raidoo (Raidoo et al., 1996).

B₁-Rezeptoren finden sich hauptsächlich im Thalamus und Hypothalamus und legen eine Funktion im Rahmen der Nozizeption, der (systemischen) Blutdruck- und Temperaturregulation nahe (Raidoo et al., 1997).

5.4.3 Wirkungen der Kinine auf das zentrale Nervensystem

Inflammatorische Reaktionen des ZNS in Folge einer direkten traumatischen und ischämischen Schädigung des Gehirns oder der Weichteile (z.B. durch ein artifizielles Weichteiltrauma) bewirken eine Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems (Rodell et al., 1997). Die Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems findet im Falle des ZNS nicht nur am Ort der primären Schädigung zunehmend statt, sondern auch perifokal, weiter peripher und sogar in Arealen der kontralateralen Hemisphäre. Dies wies Ellis anhand posttraumatisch erhöhter Kininogenkonzentrationen in Arealen im Traumafokus, perifokal und kontralateral nach (Ellis et al., 1989).

Bradykinin führt zu einer Zytokinfreisetzung (IL-1, TNF) aus Monozyten und zur Bildung verschiedener Mediatoren wie z.B. Prostaglandine und Leukotriene über die Aktivierung der Phospholipase A₂ und C, zur Ausschüttung von Neurotransmittern, Plättchen aktivierenden Faktor (PAF), Acetylcholin und Noradrenalin (s. Abb. 5.5).

Es kommt zu einer Schmerzempfindung durch direkte Stimulation der sensorischen C- und A δ -Faser-Endungen und Ausschüttung von Substanz P (potenziert durch Thromboxane, Prostaglandine und Serotonin).

Die intraventrikuläre Injektion von Bradykinin bewirkt einen Anstieg des systemischen Blutdrucks (Lewis et al., 1990). Diese RR-Erhöhung geht mit einer verminderten Konzentration von Noradrenalin im ZNS einher, die wahrscheinlich mit einer erhöhten

Konzentration von Noradrenalin, Adrenalin und 5-HAT in der Blutbahn gekoppelt ist [zur Übersicht: (Walker et al., 1995)].

Gleichzeitig kam es zu einer Tachykardie, die durch direkte kardiale Stimulation (B_2 -Rezeptoren vermittelt) und einen erhöhten Sympathikotonus der Blutgefäße hervorgerufen wurde (Madeddu et al., 1992). Die laterale septale Region scheint hierbei spezifisch für die blutdrucksteigernde Wirkung von Bradykinin zu sein.

Eine kurzzeitige (2-5 Minuten) Exzitation wurde von einer länger andauernden Sedation gefolgt. Ein ähnlicher Effekt wurde auch bei der intravasalen Gabe von Bradykinin in die A. carotis bei der Katze berichtet (Fior et al., 1993).

Ferner führte die zerebrale Injektion von Bradykinin zu einer systemischen Hyperthermie (Rao et al., 1988).

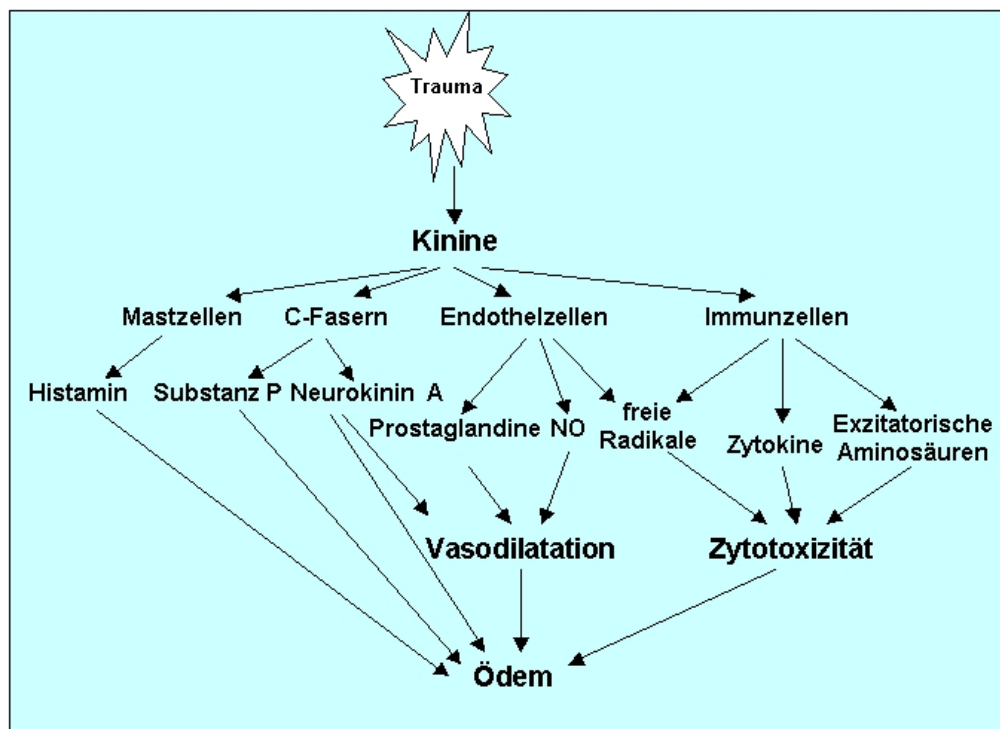


Abb. 5.5: Zusammenfassung der Kinin-Effekte auf das ZNS [aus: (Walker et al., 1995)]

5.4.4 Wirkungen von Bradykinin auf Vasomotorik und die Blut-Hirn-Schranke

Posttraumatisch kommt es zu einer erhöhten Bradykininkonzentration in Gehirn und Rückenmark (Ellis et al., 1989). Während Bradykinin die zerebralen Arteriolen maximal dilatiert, zeigt es an den postkapillären Venolen eine konstringierende Wirkung (Unterberg et al., 1983a; Unterberg et al., 1984b; Katusic et al., 1993). Eine Infusion von Bradykinin über

die A. carotis bei der Katze zeigte eine minimale Verkleinerung des intravitalmikroskopisch bestimmten Durchmessers der pialen Gefäße und eine Erhöhung des zerebralen Blutflusses (CBF) (Unterberg et al., 1984b; Unterberg et al., 1985). Kamitani wies 1985 durch intraventrikuläre Applikation von Kallikrein die Umwandlung von endogenen Kininogenen in Bradykinin und dessen dilatierende Wirkung auf zerebralen Arteriolen nach (Kamitani et al., 1985). Diese Ergebnisse ließen vermuten, daß Bradykinin hier über abluminal lokalisierte Rezeptoren wirkt. Über diese bewirkt es eine verstärkte Extravasation von Proteinen und Flüssigkeit („Bulk Flow“) mit konsekutivem Ödem durch Vasodilatation der Arteriolen, Erhöhung der vaskulären Permeabilität durch Relaxation und Separation der Endothelzellen bei gleichzeitiger Kontraktion der postkapillären Venolen und Erhöhung des Laserdoppler-Blutflusses (Unterberg et al., 1984a; Haberl et al., 1989; Wahl et al., 1985).

Die durch Bradykinin vermittelte Produktion von freien Radikalen führt zu einer vermehrten Peroxidierung der neuronalen, glialen und vaskulären Zellmembranen (Hall et al., 1993). Bradykinin und B₂-Rezeptor-Agonisten führen zu einer selektiven BHS-Öffnung für Na⁺-Fluoreszein, jedoch nicht für Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)-Albumin oder -Dextran bei Katzen (Unterberg et al., 1984a; Sanovich et al., 1995). Die Perfusion mit Na⁺-Arachidonat öffnete die BHS allerdings auch für Proteine mit einem Molekulargewicht größer als 62.000 KD (Unterberg et al., 1987). Im Gegensatz dazu bewirkte Bradykinin eine unspezifische Extravasation durch BHS-Öffnung bei Gliomgefäßen der Ratte (Inamura et al., 1994). Diese Öffnung wird wahrscheinlich durch die konstringierende Wirkung von Bradykinin auf die Endothelzellen hervorgerufen (Aufweitung der interendothelialen „tight junctions“). Bradykinin führt zu einer Entstehung und posttraumatischen Verstärkung des vasogenen Ödems (Maier-Hauff et al., 1984; Homayoun et al., 1991). Unterberg zeigte 1983, daß die Perfusion der zerebralen Ventrikel mit Bradykinin einen signifikanten Anstieg des parenchymalen Wassergehaltes bewirkt (Unterberg et al., 1983b). All diese Befunde legen eine Beteiligung von Bradykinin an Entstehung und Aufrechterhaltung des vasogenen Hirnödems nahe.

5.4.5 Kininantagonistische Substanzen und Kinin-Rezeptor-Antagonisten

Seit der Identifikation des Bradykinins als Mediator des posttraumatischen Hirnödems wurde in den letzten zwanzig Jahren eine Reihe von Substanzen zur Modulation dieser Wirkung in tierexperimentellen und klinischen Studien untersucht.

Die Gabe eines Kallikreininhibitors (Aprotinin, Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor) reduzierte die hemisphäreale Schwellung im Kälteläsions-Modell (Unterberg et al., 1986).

Einer der ersten monomeren Bradykinin-Rezeptor-Antagonisten wurde von Stavrek und Stewart 1985 entwickelt. Dieser Antagonist vermindert die dilatierende Wirkung des endogen gebildeten Bradykinin auf die zerebralen Arteriolen und könnte somit eine Rolle in der Eindämmung des posttraumatischen vasogenen Hirnödems spielen (Ellis et al., 1987).

Nach vorangegangenen erfolgversprechenden tierexperimentellen Studien testeten Marmarou und Narotam in klinischen Studien einen selektiven B₂-Rezeptor-Antagonisten CP-0127 und kamen zu ähnlichen Ergebnissen (Rodell et al., 1997; Marmarou et al., 1999); (Narotam et al., 1999). Während Marmarous Studie nur eine Tendenz der Ödem- bzw. ICP-Reduktion zeigte, wies Narotam schon eine signifikante Reduktion des ICP und einen höheren mittleren zerebralen Perfusionsdruck nach, nachdem er eine homogenere Auswahl der Gruppen hinsichtlich der Primärtraumastärke vorgenommen hatte.

Auch das postischämische Hirnödem konnte mit dem selektiven B₂-Rezeptor-Antagonisten CP-0597 reduziert werden (Relton et al., 1997).

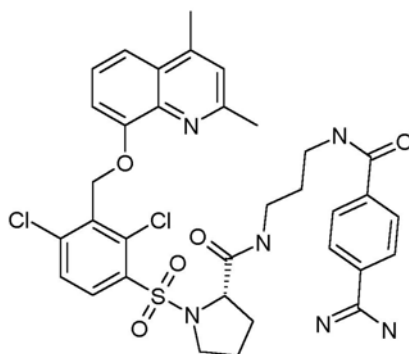
Einer der häufigsten eingesetzten und gestesteten B₂-Rezeptor-Antagonisten war bis zuletzt HOE-140, der ein selektiver, unspezifischer B₂-Rezeptor-Antagonist ist, aber auch an B₁-Rezeptoren antagonistisch wirken kann [zur Übersicht: (Stewart et al., 1996)].

5.5 Der spezifische Bradykinin-B₂-Rezeptor-Antagonist LF 16.0687 Ms

5.5.1 Chemische Struktur, Pharmakodynamik und -kinetik

Bei LF 16.0687 Ms handelt es sich um einen spezifischen Nichtpeptid-Bradykinin-B₂-Rezeptor-Antagonisten, der strukturell dem Peptid-Bradykinin-B₂-Rezeptor-Antagonisten LF 16-0335 (Dodey et al., 1998; Pruneau et al., 1998; Pruneau et al., 1999b; Pruneau et al., 1999a) verwandt ist und im Gegensatz zu HOE-140 keine partialagonistischen Eigenschaften besitzt (Pruneau et al., 1998; Feletou et al., 1994) (s. Abb. 5.6). Aufgrund dieser nonpeptidischen Eigenschaft und seiner geringen Molekülgröße (949,9 KD / Gd-DTPA: 550

D; Albumin: 65.000 D) ist anzunehmen, daß LF 16.0687 Ms in das zerebrale Parenchym bei vorhandenem BHS-Schaden gelangen kann. Unterstützt wird diese Annahme durch den Sachverhalt, daß LF 16.0687 Ms bei peripherer Verabreichung in einer Dosierung von 10 mg/kg KG Konzentrationen zwischen 10 und 12 nmol im Hirnparenchym bei intakter BHS erreichte (unveröffentlichte Daten von Pruneau et al.).



(1-[[2,4-dichloro-3-[(2,4-dimethylquinolin-8-yl)oxy]methyl]phenyl]sulfonyl)-N-[3-[[4-(aminoiminomethyl)phenyl] carbonylamino]propyl]-2(S)-pyrrolidincarboxamid
(LF 16.0687 Ms ist die di-mesylat Salz-Form von LF 16.0687)

Abb. 5.6: Chemische Strukturformel von LF 16.0687 [aus:(Pruneau et al., 1999a)]

Das pharmakologische Profil von LF 16.0687 Ms und die Wirkung auf das posttraumatische Hirnödem im Closed Head Trauma-Modell wurden bereits charakterisiert (Pruneau et al., 1999a; Pruneau et al., 1999b). In der Studie, die Pruneau 1999 zur Charakterisierung des pharmakologischen Profils durchführte, konnte das 60 Minuten vor einer Bradykinininfusion subkutan injizierte LF 16.0687 Ms Bradykinin-B₂-Rezeptoren selektiv hemmen. Dazu wurden Zell-Linien verwendet, die von der menschlichen Umbilikalvene, dem Uterus der Ratte und dem Ileum des Meerschweins stammten (Pruneau et al., 1999a).

Konzentrationen bis 19 µM verhinderten nicht die Bindung von [³H]-des-Arg¹⁰-[Leu⁹]kallidin an menschliche Bradykinin B₁-Rezeptoren; ein B₁-Antagonismus konnte also ausgeschlossen werden. Am B₂-Rezeptor ist LF 16.0687 Ms mit einer IC₅₀ von 3nM ca. 1000mal effektiver als CP-0127 (Pruneau et al., 2000).

Ferner konnte ein Antagonismus an Adenosin- (A₁₋₂), Adreno- (α₁₋₂, β₁₋₃), Angiotensin- (AT₁₋₂), Cholezystokinin- (CCK₁₋₂) Dopamin- (D₁₋₃), Endothelin- (ET_{A-B}), GABA_{A-B}-, Glutamat- (AMPA), Histamin- (H₁₋₃), Leukotrien- (BLT) und CysLT₁-, nikotinerge Cholinorezeptoren, Neurotensin- (NST₁), Opioid (μ, δ und κ), 5-Hydroxytryptamin- (5-HT_{1A}, 1D, 2A, 3, 4), Vasopressin (V₁₋₂)-Rezeptoren, ausgeschlossen werden. Ebenfalls keine Wirkung

konnte an L-Typ Ca^{2+} -Kanälen, N-Typ Ca^{2+} -Kanälen, ATP-sensitive K^{+} -Kanälen, Ca^{2+} -abhängige K^{+} -, Na^{+} - und Cl^{-} -Kanälen nachgewiesen werden.

Nur die muskarinergen M_1 und M_2 Cholinorezeptoren wurden mit einer ED_{50} von 0,46 μM , bzw. 0,30 μM blockiert.

Da die konzentrationsabhängige Steigerung der Inositolphosphat-Produktion durch Bradykinin durch LF 16.0687 Ms deutlich abgeschwächt wurde, konnte man auch in den funktionellen Tests, die an der menschlichen Umbilikalvene, Rattenuterus und Meerschwein-Ileum durchgeführt wurden eine Abschwächung der kontraktionssteigernden Wirkung von Bradykinin beobachten (Pruneau et al., 1999a).

Auch der auf eine Bradykinin-Injektion folgende Blutdruckabfall wurde durch LF 16.0687 Ms antagonisiert (maximaler Effekt 5 Minuten nach Beginn der Infusion (Pruneau et al., 1999a)).

Die durch Bradykinin verursachte Extravasation von Evans Blue nach vorheriger Infusion wurde in Pankreas, Magen und Duodenum durch LF 16.0687 Ms signifikant um 56 bis 69 % reduziert (Pruneau et al., 1999a).

5.5.2 Andere tierexperimentelle Untersuchungen an Trauma-Modellen

Testungen von LF 16.0687 Ms am Weight-Drop- und Kälteläsionsmodell ergaben:

Sowohl nach diffuser Schädigung [64%ige Reduktion des posttraumatischen zerebralen Wassergehaltes (Pruneau et al., 1999b)] als auch im Kälteläsionsmodell [31%ige Reduktion der hemisphäralen Schwellung (Plesnila et al., 2001)] zeigte sich eine signifikante Reduktion des posttraumatischen Hirnödems und eine damit verbundene Verbesserung der posttraumatischen neurologischen Funktion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es kam zu keiner Beeinflussung des mittleren arteriellen Blutdruckes oder der arteriellen Blutgase durch die Substanz. In der Studie im Rahmen des Weight-Drop-Modells wurde - wie auch in der hier vorliegenden Studie mit dem CCII-Modell - eine Anhebung des Wassergehalts um ca. 1,3 % in der nicht-traumatisierten Hemisphäre (ca. 79,5 %) gegenüber nicht-traumatisierten Tieren (ca. 78,5 %) festgestellt (Pruneau et al., 1999b). In der Studie von Pruneau am Weight Drop-Modell reduzierte die Substanz dosisabhängig (100 mg/kg KG) den minimal erhöhten Wassergehalt der nicht-traumatisierten Hemisphäre, der bei den mit physiologischer Kochsalzlösung therapierten Tieren aufgefallen war (Pruneau et al., 1999b).

5.5.3 Interpretation der Therapiestudien mit LF 16.0687 Ms

Die in der aktuellen Therapiestudie beobachtete Reduktion der hemisphäralen Schwellung steht im Einklang mit den in anderen Schädel-Hirn-Trauma-Modellen erzielten Ergebnissen, bei denen die vasogene Komponente des posttraumatischen Hirnödems im Vordergrund steht (Plesnila et al., 2001; Pruneau et al., 1999b). Tiere, die den Bradykinin-B₂-Rezeptor-Antagonisten (Dosis: 3 mg/kg KG) erhielten und zusätzlich magnetresonanztomographisch untersucht wurden, wiesen eine geringere Reduktion der hemisphäralen Schwellungswerte auf. Allerdings fiel hier auch eine insgesamt um ca. 50 % stärkere Ausprägung der hemisphäralen Schwellung bei allen Tieren auf. Die einzigen Modifikationen der Methodik gegenüber der alleinigen Traumatisierung und der nachfolgenden Bestimmung der hemisphäralen Schwellung mittels Feucht-Trocken-Gewichten war zum einen der zur besseren Kontrastierung mit Zahnzement wiedereingesetzten Knochendeckel. Eine wesentliche Steigerung der Kompression (und somit auch der Läsionsgröße), die bei der unverschlossenen Kraniektomie fehlt, ist hier als wahrscheinlicher Grund zu sehen. Dies konnte auch in Studien an Mäusen bemerkt werden, denen kurz nach CCII der Knochendeckel wiedereingesetzt wurde, was zu einer 40%igen Steigerung der Läsionsgröße nach 24 Stunden führte (Zweckenberger et al., 2003). In Kombination damit kann aber auch die im Rahmen der MRT-Untersuchungen notwendige längere Narkosedauer (insgesamt ca. 3 Stunden mehr) ursächlich mitverantwortlich sein. Dies müßte Gegenstand weiterführender Studien sein.

Ein Anstieg des Wassergehaltes der nicht-traumatisierten Hemisphäre von traumatisierten und sogar nicht-traumatisierten Tiere unter der Therapie mit LF 16.0687 Ms wurde ebenfalls in früheren Studien mit dieser Substanz beobachtet (Pruneau et al., 1999b). Die Ursache dieses substanzspezifischen Phänomens bleibt ebenfalls unklar. In Erwägung sind hierbei sich potenzierende Effekte zu ziehen wie z.B. der Anstieg der Bradykininkonzentration intrazerebral durch den Operationsstreß durch die Kraniektomie, aber auch der biphasische Anstieg der Kallikreinkonzentration der nicht-traumatisierten Hemisphäre, den Rodell beobachtete (Rodell et al., 1997). LF 16.0687 Ms könnte diese Mechanismen negativ beeinflussen, bzw. durch vorzeitigen Verschluß der Bluthirnschranke auch auf der nicht-traumatisierten Seite die Rückbildung eines temporär auftretenden leichten Ödems verzögern.

Die fehlende Steigerung des therapeutischen Effektes der Substanz durch eine höhere Dosis läßt sich möglicherweise durch die Beobachtung erklären, daß die Substanz bei

subkutaner Applikation in der Dosis von 30 mg/kg KG kristallisierte und zum Teil eine subkutane Nekrose an der Injektionsstelle hervorrief. Es könnte sein, daß die Substanz dadurch unzureichend resorbiert wurde.

5.6 Vergleich der Quantifizierungsmöglichkeiten des posttraumatischen Hirnödems mittels MRT und Gravimetrie

Zur gravimetrischen Quantifizierung des Hirnödems bieten sich zwei Parameter an:

Die posttraumatische hemisphärale Schwellung (Gewichtszunahme) der traumatisierten Hemisphäre durch die Ödemflüssigkeit und der Wassergehalt beider Hemisphären. Dieser errechnet sich aus der Differenz zwischen Feucht- und Trockengewicht einer Hemisphäre.

Da verschiedene Pharmaka, die die Bradykininwirkung modulieren, auch den Wassergehalt der Kontrollhemisphäre verändern, müssen zur exakten Analyse der Wirkung einer Substanz beide Parameter herangezogen werden.

Einer der Nachteile der gravimetrischen Methode ist, daß durch die zum Teil erhebliche Verlagerung der Medianebene eine exakte Trennung der Hemisphären in der idealen Mittellinie nahezu unmöglich ist. Dieses Problem läßt sich zwar durch die Verwendung eines Operationsmikroskopes und die Anwendung einer Korrekturformel minimieren, eine exaktere Methode wäre hier jedoch wünschenswert.

Die Gravimetrie setzt immer auch die Tötung des Tieres zum Zeitpunkt der Bestimmung der hemisphäralen Schwellung voraus. Die Anzahl der benötigten Tiere wird durch die mögliche Mehrfachmessung eines Tieres mittels MRT-Bildgebung zu verschiedenen Zeitpunkten stark reduziert.

Ferner lassen sich diverse Zusatzuntersuchungen an demselben Tier vornehmen, die die Narkosedauer nur unwesentlich verlängern. Eventuelle Fehlauswertungen lassen sich an dem gewonnenen Datenbestand durch erneute Auswertung korrigieren.

Ein limitierender Faktor der MRT-Methoden ist die zusätzliche Narkose, die zur bewegungsfreien Positionierung des Tieres im Tomographen notwendig ist, und das Hirnödem eventuell bei längerer Dauer beeinflußt.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Das posttraumatische Hirnödem trägt zur erhöhten Morbidität und Mortalität Schädel-Hirn-traumatisierter Patienten bei und ist u.a. Ausdruck einer Blut-Hirn-Schranken-Störung. Die Magnetresonanztomographie (MRT) erlaubt bei dieser Traumaentität neben der rein morphologischen Darstellung der Läsion in T2-gewichteter Bildgebung auch die funktionelle Diagnostik der Blut-Hirnschranken-Funktion anhand der Kontrastmittelextravasation, z.B. von Gadolinium-DTPA, in T1-gewichteter Bildgebung. Hierdurch ist es möglich das antiödematöse Potential systemisch applizierter Substanzen zu evaluieren.

Das vasodilatierende Bradykinin führt als einer der Hauptbestandteile des Kallikrein-Kinin-Systems durch eine Aktivierung der endothelialen Bradykinin-B₂-Rezeptoren zu einer Öffnung der Blut-Hirn-Schranke und trägt damit zur Entstehung und Aufrechterhaltung des vasogenen bzw. zytotoxischen Hirnödems bei. Die selektive Hemmung der B₂-Rezeptoren soll die Ausbreitung des posttraumatisch vasogenen Hirnödems verhindern.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Entwicklung des vasogenen Hirnödems, der hemisphäralen Schwellung und der Integrität der Blut-Hirn-Schranke im zeitlichen Verlauf bis 7 Tage nach Controlled Cortical Impact Injury (CCII) an Ratten anhand T2- und T1-gewichteter MRT-Bildgebung näher charakterisiert. Im zweiten Teil wurde eine mögliche therapeutische Beeinflußbarkeit des posttraumatischen Ödems und der Blut-Hirn-Schrankenöffnung durch frühe Gabe des spezifischen B₂-Antagonisten LF 16.0687 Ms unter der Anwendung magnetresonanztomographischer und gravimetrischer Methoden untersucht.

In den T2-gewichteten Sequenzen kam es innerhalb der ersten 90 Minuten zum prozentual stärksten Anstieg der Schwellung der traumatisierten Hemisphäre nach CCII ($5,84 \pm 0,59$ %). Die maximale hemisphärale Schwellung lag in der Zeit zwischen 24 und 48 Stunden vor ($14,12 \pm 1,47$ % und $15,24 \pm 1,49$ %) und nahm im weiteren Verlauf bis 7 Tage nach CCII um 7 % ab. In den T1-gewichteten Aufnahmen erreichte die durch die Extravasation von Gadolinium-DTPA erzeugte Kontrastverstärkung innerhalb des Läsionszentrums bereits 6 Stunden nach CCII ein Maximum, während sie in der Ödemperipherie zu diesem Zeitpunkt noch zunahm und nach 48 Stunden Maximalwerte erreichte. Bei einer frühzeitigen Gabe des Kontrastmittels 90 Minuten nach CCII kam es im Verlauf zu einer signifikant höheren Kontrastverstärkung innerhalb der traumatisierten Hemisphäre, was durch eine Retention des extravasierten Kontrastmittels erklärt werden kann. Dies könnte mit den zuvor erwähnten

Ergebnissen für eine frühe Restitution der Blut-Hirn-Schranken Integrität innerhalb der Kontusion sprechen, während der Verschuß perikontusionell erst später erfolgt.

Der spezifische B₂-Antagonist LF 16.0687 Ms führte bei frühzeitiger Gabe nach CCII verglichen mit den Kontrolltieren zu einer signifikanten Reduktion der gravimetrisch bestimmten posttraumatischen hemisphäralen Schwellung um 27%. In einer weiteren Meßreihe konnte LF 16.0687 Ms den anhand T2-gewichteter Aufnahmen planimetrisch bestimmten Schwellungsanstieg der traumatisierten Hemisphäre ebenfalls reduzieren. Hierbei korrelierte die magnetresonanztomographisch ermittelte hemisphärale Schwellung signifikant mit den gravimetrisch gemessenen Werten (Spearman-Koeffizient: 0,87).

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wird deutlich, daß für die Behandlung des Ödems aufgrund der posttraumatischen Blut-Hirn-Schranken-Dynamik ein therapeutisches Fenster nur für wenige Stunden nach dem Trauma besteht. Obwohl die posttraumatische diagnostische Bildgebung zweifelsfrei eine Domäne der Computertomographie ist, stellt die Magnetresonanztomographie zwar eine zeit- und kostenaufwendige, aber auch konkurrenzlose Methode dar, mit der die Entwicklung der hemisphäralen Schwellung und der Zustand der Blut-Hirn-Schranke dargestellt und quantifiziert werden kann. Sie wird zukünftig die Charakterisierung möglicher zerebraler Angriffspunkte neuroprotektiver Medikamente erleichtern.

7. Literaturverzeichnis

- Aarabi, B. und Long, D. M. (1979): Dynamics of cerebral edema. *J Neurosurg*, 51: 779-784.
- Adelson, P. D., Whalen, M. J., Kochanek, P. M., Robichaud, P. und Carlos, T. M. (1998): Blood brain barrier permeability and acute inflammation in two models of traumatic brain injury in the immature rat: A preliminary report. *Acta Neurochir, Suppl.*, 71: 104-106.
- Baethmann, A (1978): Pathophysiological and pathochemical aspects of cerebral edema. *Neurosurg Rev*, 1: 85-100.
- Baethmann, A., Lehr, D., Wirth, A. und et al. (1998): Prospective analysis of patient management in severe head injury. *Acta Neurochir, Suppl.*, 71: 107-110.
- Baethmann, A., Maier-Hauff, K., Schürer, L., Lange, M., Kempfski, O. und Unterberg, A. (1983): The effect of high intracranial pressure on activation and release of mediator compounds in traumatic vasogenic brain edema. *Intracranial Pressure V.* Berlin/Heidelberg/New York: Springer Verlag: 405-412.
- Baldwin, S. A., Fugaccia, I., Brown, D. R., Brown, L. V. und Scheff, S. W. (1996): Blood brain barrier Breach following cortical contusion in the rat. *J Neurosurg*, 85: 476-481.
- Barzó, P., Marmarou, A., Corwin, F. und Dunbar, J. G. (1997): Acute blood-brain barrier changes in experimental closed head injury as measured by mri an gd-dtpa. *Acta Neurochir, Suppl.*, 70: 243-246.
- Barzó, P., Marmarou, A., Fatouros, P. und Corwin, F. (1996): MRI-monitored acute blood-brain barrier changes in experimental traumatic brain injury. *J Neurosurg*, 85: 1113-1121.
- Barzó, P., Marmarou, A., Fatouros, P., Hayasaki, K. und Corwin, F. (1997): Biphasic pathophysiological response of vasogenic and cellular edema in traumatic brain swelling. *Acta Neurochir, Suppl.*, 70: 119-122.
- Baskaya, M. K., Rao, A. M., Dogan, A. und et al (1997): The biphasic opening of the blood- brain barrier in the cortex and hippocampus after traumatic brain injury in rats. *Neurosci Lett*, 226: 33-36.
- Bhoola, K. D., Evans, R. H. und Forster, M. R. (1987): Excitatory effect of bradykinin on spinal neurones. *Br.J.Pharmacol*, 90: 1-15.

- Bhoola, K. D., Figueroa, C. D. und Worthy, K. (1992): Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev*, 44: 1-80.
- Bryan, Jr. R. M., Cherian, L. und Robertson, C. (1995): Regional cerebral blood flow after controlled cortical impact injury in rats. *Anaesth Anlag*, 80: 687-695.
- Bullock, R., Chesnut, R. M., Clifton G., Ghajar, J., Marion, D. W., Narayan, R. K., Newell, D. W., Pitts, L. H., Rosner, M. J. und Wilberger, J. W. (1996): Guidelines for the management of severe head injury. Brain Trauma Foundation. *Eur J Emerg Med*, 3: 109-127.
- Bullock, R., Satharn, P., Patterson J und et al (1990): The time course of vasogenic brain edema after focal human head injury - evidence from SPECT mapping of blood brain barrier defects. *Acta Neurochir, Suppl.*, 51: 286-288.
- Butt, A. M. und et al (1995): Effect of inflammatory agents on electrical resistance across the blood-brain barrier in pial microvessels of anaesthetized rats. *Brain Res*, 696: 145-150.
- Chao, J., Swain, C. C., Tsai, J. und Margolius, H. S. (1987): Tissue kallikrein in the rat brain and pituitary: Regional distribution and oestrogen induction in the anterior pituitary. *Endocrinology*, 120: 475-482.
- Chesnut, R. M., Marshall, L. F., Klauber, M. R., Blunt, B. A., Eisenberg, H. M., Jane, J. A., Marmarou, A. und Foulkes, M. A. (1993): The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury. *J Trauma*, 34: 216-222.
- Cholewinski, A. J., Stevens, G. und Wilkin, G. P. (1991): Identification of B2 bradykinin binding sites on cultured cortical astrocytes. *J Neurochem*, 57: 1456-1458.
- Copeland, J. R., Willoughby, K. A., Tynan, T. M., Moore, S. F. und Ellis, E. F. (1995): Endothelial and nonendothelial cyclooxygenase mediate rabbit pial arteriole dilation by bradykinin. *Am Physiol Soc*, H458-H466.
- Cserr, H. F., Cooper, D. N. und Milhorat, T. H. (1977): Flow of cerebral interstitial fluid as indicated by the removal of extracellular markers from rat caudate nucleus. *Experimental Eye Research, Suppl.*, 25: 461-473.
- Davis, K. D. und Dostrovsky, J. O. (1988): Cerebrovascular application of bradykinin excites central sensory neurons. *Brain Res*, 446: 401-406.
- Deisenroth, K., Meinig, G. und Schurmann, K. (1990): Dose- and time-dependent dexamethasone effects in cold lesion-induced brain edema in the rat. *Neurochirurgia*, 33: 1-7.

- Dixon, C. E., Clifton, G. L., Lighthall, J. W., Yaghmai, A. A. und Hayes, R. L. (1991): A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J Neurosci Methods*, 39: 253-262.
- Dixon, C. E., Lyeth, B. G., Povlishock, J. T. und et al. (1987): A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. *J Neurosurg*, 67: 110-119.
- Doctrow, S. R., Abelleira, S. M., Curry, L. A. und et al (1994): The bradykinin analog RMP-7 increases intracellular free calcium levels in rat brain microvascular endothelial cells. *Journal of Pharmacology and experimental therapeutics*, 271: 229-237.
- Dodey, P., Pruneau, D. und Barth, M. (1998): New nonpeptide bradykinin B₂ receptor antagonists. Präsentiert beim 13.französisch-japanischen Symposium Medicinal and Fine Chemistry (Mai 1998),
- Elliot, K. A. C. und Jasper, H. (1949): Measurement of experimentally induced brain swelling and shrinkage. *American Journal of Physiology*, 157: 122-129.
- Ellis, E. F., Chao, J. und Heizer, M. L. (1989): Brain kininogen following experimental brain injury: evidence for a secondary event. *J Neurosurg*, 71: 437-442.
- Ellis, E. F., Heizer, M. L., Hambrecht, G. S., Holt, S. A., Stewart, J. M. und Vavrek, R. J. (1987): Inhibition of bradykinin- and kallikrein-induced cerebral arteriolar dilatation by a specific bradykinin antagonist. *Stroke*, 18: 792-795.
- Eriskat, J., Schürer, L., Kempfski, O. und et al (1994): Growth kinetics of a primary brain tissue necrosis from a focal lesion. *Acta Neurochir, Suppl.*, 60: 425-427.
- Farooqui, A. A., Anderson, D. K., Flynn, C., Bradel, E., Means, E. D. und Horrocks, L. A. (1990): Stimulation of mono- and diacylglycerol lipase activities by bradykinin in neural cultures. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 166: 1001-1009.
- Feeney, D. M., Boyeson, M. G., Linn, R. T., Murray, H. M. und Dail, W. G. (1981): Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain Res*, 211: 67-77.
- Feletou, M., Germain, M., Thureau, C., Fauchere, J. L. und Canet, E. (1994): Agonistic and antagonistic properties of the bradykinin B₂-receptor antagonists, Hoe 140, in isolated blood vessels from different species. *Br J Pharmacol*, 112: 683-689.

- Fior, D. R., Martins, D. T. O. und Lindsey, C. J. (1993): Localisation of central pressor action of bradykinin in medulla oblongata. American Physiological Society, H1000-H1006.
- Francel, P. C. (1992): Bradykinin and neuronal injury. *J Neurotrauma*, 9: 27-46.
- Fujiwara, Y., Mantione, C. R. und Yamamura, H. I. (1988): Identification of B2 bradykinin binding sites in guinea-pig brain. *Eur.J Pharmacol*, 147: 487-488.
- Guillot, F. L. und Audus, K. L. (1990): Angiotensin peptide regulation of fluid-phase endocytosis in brain microvessel endothelial cell monolayers. *J Cereb.Blood Flow Metab.*, 10: 827-834.
- Haberl, R. L., Heizer, M. L. und Ellis, E. F. (1989): Laser-Doppler assessment of brain microcirculation: effect of local alterations. American Physiological Society, H1255-H1260.
- Hall, E.D. und Braughler, J.M. (1993): Free radicals in CNS injury. *Molecular and Cellular Approaches to the Treatment of Neurological Disease*, 81-105.
- Hannay, H. J., Feldman, L., Phan, P., Keyani, A., Panwar, N., Goodman, J. C. und Robertson, C. S. (1999): Validation of a controlled cortical impact model of head injury in mice. *J Neurotrauma*, 16: 1103-1114.
- Hayasaki, K., Marmarou, A., Barzo, P., Fatouros, P. und Corwin, F. (1997): Detection of brain atrophy following traumatic brain injury using gravimetric techniques. *Acta Neurochir, Suppl.*, 70: 75-77.
- Holodny, A. I., Nusbaum, A. O., Festa, S., Pronin, I. N., Lee, H. J. und Kalnin, A. J. (1999): Correlation between the degree of contrast enhancement and the volume of peritumoral edema in meningiomas and malignant gliomas. *Neuroradiology*, 41: 820-825.
- Homayoun, P. und Harik, S. I. (1991): Bradykinin receptors of cerebral microvessels stimulate phosphoinositide turnover. *J.Cereb.Blood Flow Metab.*, 11: 557-566.
- Hösli, E. und Hösli, L. (1993): Autoradiographic localisation of binding sites for neuropeptide Y and bradykinin on astrocytes. *NeuroReport*, 4: 159-162.
- Ikeda, J., Ma, L., Morita, I. und Murota, S. (1994): Involvement of nitric oxide and free radical (O₂⁻) in neuronal injury induced by deprivation of oxygen and glucose in vitro. *Acta Neurochir, Suppl.*, 60: 94-97.
- Ikeda, Y. und Long, D. M. (1990): The molecular basis of brain injury and brain edema: the role of oxygen free radicals. *Neurosurg*, 27: 1-11.

- Inamura, T. und Black, K. L. (1994): Bradykinin selectively opens blood-brain barrier in experimental brain tumors. *J Cereb.Blood Flow Metab.*, 14: 862-870.
- Ito, J., Marmarou, A., Barzo, P., Fatouros, P. und Corwin, F. (1996): Characterisation of edema by diffusion-weighted imaging in experimental traumatic brain injury. *J Neurosurg*, 84: 97-103.
- Kaieda, R., Todd, M. M., Weeks, J. B. und Warner, D. S. (1989): A comparison of the effects of halothane, isoflurane, and pentobarbital anesthesia on intracranial pressure and cerebral edema formation following brain injury in rabbits. *Anaesth*, 71: 571-579.
- Kamitani, T., Little, M. H. und Ellis, E. F. (1985): Evidence for a possible role of the brain kallikrein-kinin system in the modulation of the cerebral circulation. *Circ Res*, 57: 545-552.
- Kamiya, T., Katayama, Y., Kashiwagi, F. und Terashi, A. (1993): The role of bradykinin in mediating ischemic brain edema in rats. *Stroke*, 24: 571-576.
- Kariya, K., Yamauchi, A. und Sasaki, T. (1985): Regional distribution and characterisation of kinin in the cns of the rat. *J Neurochem*, 44 No.6: 1892-1897.
- Katayama, Y., Becker, D. P., Tamura, T. und Havda, D. A. (1990): Massive increases in extracellular potassium and the indiscriminate release of glutamate following concussive brain injury. *J Neurosurg*, 73: 889-900.
- Katusic, Z. S., Milde, J. H., Cosentino, F. und Mitrovic, B. S. (1993): Subarachnoid hemorrhage and endothelial L-arginine pathway in small brain stem arteries in dogs. *Stroke*, 24: 392-399.
- Kempski, O. (2001): Cerebral edema. *Semin Nephrol*, 21: 303-307.
- Kilgore, D. P., Greger, R. K., Daniels, D. L., Pojunas, K. W., Williams, A. L. und Haughton, V. M. (1987): Cranial tissues: Normal mr appearance after intravenous injection of Gd-DTPA. *Radiology*, 160: 757-761.
- Klatzo, I (1967): Neuropathological aspects of brain edema. *Journal of Neuropathol Exp Neurology*, 26: 1-14.
- Klatzo, I., Chui, E., Fujiwara, K. und Spatz, M. (1980): Resolution of vasogenic brain edema. *Adv Neurol*, 28: 359-373.
- Klatzo, I. und et al (1987): Pathophysiological aspects of brain edema. *Acta Neuropath*, 72: 236-239.

- Kroppenstedt, S. N., Stover, J. F. und Unterberg, A. W. (2000): Effects of dopamine on posttraumatic cerebral blood flow, brain edema, and cerebrospinal fluid glutamate and hypoxanthine concentrations. *Crit Care Med*, 28: 3792-3798.
- Kuroiwa, T., Ueki, M., Chen, Q., Suemasu, H., Taniguchi, I. und Okeda, R. (1994): Biomechanical characteristics of brain edema: The difference between vasogenic-type and cytotoxic-type edema. *Acta Neurochir, Suppl.*, 60: 158-161.
- Lee, J. G., Smith, J. J., Hudetz, A. G., Hillard, C. J., Bosnjak, Z. J. und Kampine, J. P. (1995): Laser-doppler measurement of the effects of halothane and isoflurane on the cerebrovascular CO₂ response in the rat. *Anaesth Analg*, 80: 696-702.
- Lewis, R. E., Hoffman, W. E. und Phillips, I. (1990): Angiotensin II and bradykinin: interactions between two centrally active peptides. *American Physiological Society*, R285-R261.
- Lighthall, J. W. (1988): Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. *J Neurotrauma*, 5: 1-15.
- Madeddu, P., Anania, V. und et al (1992): Role of brain kallikrein-kinin system in regulation of adrenocorticotropin release. *American Journal of Physiology*, E312-E318.
- Maier-Hauff, K., Baethmann, A., Lange, M., Schürer, L. und Unterberg, A. (1984): The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema Part2: Studies on kinin formation in focal and perifocal brain tissue. *J Neurosurg*, 61: 97-106.
- Marmarou, A. (1994): Traumatic brain edema: an overview. *Acta Neurochir, Suppl.*, 60: 421-424.
- Marmarou, A., Foda MA, van den Brink W, Campbell J, Kita H und Demetriadou K (1994): A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg*, 80: 291-300.
- Marmarou, A., Nichols, J., Burgess, J. und et al (1999): Effects of the bradykinin antagonist bradycor (Deltibant, CP-1027) in severe traumatic brain injury: results of a multi-center, randomized, placebo-controlled trial. *J Neurotrauma*, 16: 431-444.
- McIntosh, T. K., Juhler, M. und Wieloch, T. (1998): Novel pharmacologic strategies in the treatment of experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 15: 731-766.
- McIntosh, T. K., Soares, H., Thomas, M. und Cloherty, K. (1990): Development of regional cerebral oedema after lateral fluid-percussion brain injury in the rat. *Acta Neurochir, Suppl.*, 51: 263-264.

- Michenfelder, J.D. (1980): The cerebral circulation. The circulation in anaesthesia,
- Miller, R. J. (1987): Bradykinin highlights the role of phospholipid metabolism in neuronal excitability. *Trends Neurol.Sci.*, 10: 226.
- Moreau, T., Gutman, N., Elmoujahed, A., Esnard, F. und Gauthier, F. (1986): Relationship between the cysteine-protease-inhibitory function of the rat t-kininogen and the release of immunoreactive kinin upon trypsin treatment. *Eur.J.Biochem.*, 159: 341-346.
- Murr, R., Schürer, L., Berger, S., Enzenbach, R. und Baethmann, A (1990): Effects of anaesthetic agents on cerebral blood flow and brain oedema from a focal lesion in rabbit brain. *Acta Neurochir, Suppl.*, 51: 97-99.
- Narotam, P. K., Rodell, T. C., Nadvi, S. S. und et al (1999): Traumatic brain contusions: a clinical role for the kinin antagonist CP-1027. *Acta Neurochir*, 140: 793-803.
- Nawashiro, H., Shima, K. und Chigasaki, H. (1994): Blood-brain barrier, cerebral blood flow, and cerebral plasma volume immediately after head injury in the rat. *Acta Neurochir, Suppl.*, 60: 440-442.
- Ohata, K. und Marmarou, A. (1992): Clearance of brain edema an macromolecules through the cortical extracellular space. *J Neurosurg*, 77: 387-396.
- Pappius, H. M. und Wolfe, L. S. (1983): Effects of indomethacin and ibuprofen on cerebral metabolism and blood flow in traumatized brain. *J Cereb.Blood Flow Metab.*, 3: 448-459.
- Pardridge, W. M. (1999): Blood-brain barrier biology and methodology. *J Neurovirol*, 5: 556-569.
- Pellegrino, L. J., Pellegrino, A. S. und Cushman, A. J. (1979): *A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain*. 2nd Edition:
- Perry, D. C. und Snyder, S. H. (1984): Identification of bradykinin in mamalian brain. *J Neurochem*, 43: 1072-1080.
- Pickard, J. D. (1981): Role of prostaglandins and arachidonic acid derivates in the coupling of cerebral blood flow to cerebral metabolism. *J Cereb.Blood Flow Metab.*, 1: 361-384.
- Plesnila, N., Schulz, J., Stoffel, M., Eriskat, J., Pruneau, D. und Baethmann, A. (2001): Role of bradykinin B2 receptors in the formation of vasogenic brain edema in rats. *J Neurotrauma*, 18: 1049-1058.
- Povlishock JT (2000): Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 17: 453-537.

- Privitera, P. J., Daum, P. R., Hill, D. R. und Hiley, C. R. (1991): Autoradiographic visualisation and characteristics of [¹²⁵I] bradykinin binding sites in guinea pig brain. *Brain Res*, 577: 73-79.
- Pruneau, D., Chorny, J., Benkowitz, V. und et al (1999): Effect of LF 16-0687Ms, a new non peptide bradykinin B₂ receptor antagonist in a rat model of closed head trauma. *J Neurotrauma*, 16: 1057-1065.
- Pruneau, D., Luccarini, J. M. und Fouchet, C. (1998): LF 16.0335, a novel potent and selective nonpeptide antagonist of the human bradykinin-B₂-receptor. *Br J Pharmacol*, 125: 365-372.
- Pruneau, D., Paquet, J. L., Luccarini, J. M. und et al (1999): Pharmacological profile of LF 16-10687 Ms, a new potent non-peptide bradykinin B₂ receptor antagonist. *Immunopharmacol*, 43: 187-194.
- Pruneau, D., Paquet, J. M., Luccarini, J. M., Defrene, E., Fouchet, C., Franck, B., Loillier, C., Robert, C., Cremers, B., Vernier, M. und Dodey, P. (2000): LF16-0687 Ms - a novel non-peptide bradykinin B₂ receptor antagonist. *Restor.Neurol.Neurosci.*, 16: 177 (Abstract).
- Raidoo, D. M. und Bhoola, K. D. (1997): Kinin receptors on human neurones. *J Neuroimmunol*, 77: 39-44.
- Raidoo, D. M., Ramchurren, N., Naidoo.Y., Naidoo, S., Müller-Esterl, W. und Bhoola, K. D. (1996): Visualisation of bradykinin B₂ receptors on human brain neurons. *Immunopharmacol*, 33: 104-107.
- Rao, P. J. R. M. und Bhattacharya, S. K. (1988): Hyperthermic effect of centrally administered bradykinin in the rat. *Int Journal of Hypertermia*, 4: 183-189.
- Regoli, D., Allogho, S. N., Rizzi, A. und et al (1998): Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur J Pharmacol*, 348: 1-10.
- Regoli, K. und Barabe, J. (1980): Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol.Rev.*, 32: 1-46.
- Relton, J. K., Beckey, V. E., Hanson, W. L. und Whalley, E. T. (1997): CP-0597, a selective bradykinin B₂ receptor antagonist, inhibits brain injury in a rat model of reversible middle cerebral artery occlusion. *Stroke*, 28: 1430-1436.
- Reulen, H. J., Graham, R., Spatz, M. und Klatzo, I. (1977): Role of pressure gradients and bulk flow in dynamics of vasogenic brain edema. *J Neurosurg*, 46: 24-36.

- Rodell, T. C. und et al (1997): The kallikrein/kinin system and kinin antagonists in trauma. *Immunopharmacol*, 333: 279-283.
- Sanovich, E., Bartus, R. T., Friden, P. M., Dean, R. L., Le, H. Q. und Brightman, M. W. (1995): Pathway across blood-brain barrier opened by bradykinin agonist, RMP-7. *Brain Res*, 705: 125-135.
- Schachter, M. (1979): Kallikreins (kininogenases)- a group of serine proteases with bioregulatory actions. *Pharmacological Rev*, 31: 1-17.
- Schilling, L. und Wahl, M. (1994): Effects of antihistaminics on experimental brain edema. *Acta Neurochir, Suppl.*, 60: 79-82.
- Schilling, L. und Wahl, M. (1997): Brain edema: Pathogenesis and therapy. *Kidney Int.*, 51, Suppl. 59: 69-75.
- Schilling, L. und Wahl, M. (1999): Mediators of cerebral edema. *Adv Exp Med Biol*, 474: 123-141.
- Schneider, G. H., Hennig, S., Lanksch, W. R. und Unterberg, A. (1994): Dynamics of posttraumatic brain swelling following a cryogenic injury in rats. *Acta Neurochir*, 60: 437-439.
- Schürer, L., Temesvari, P., Wahl, M., Unterberg, A und Baethmann, A (1989): Blood-brain barrier permeability and vascular reactivity to bradykinin after pretreatment with dexametasone. *Acta Neuropath*, 77: 576-581.
- Shapira, Y., Setton, D., Artru, A. A. und Shohami, E. (1993): Blood-brain barrier permeability, cerebral edema, and neurologic function after closed head injury in rats. *Anaesth Anlag*, 77: 141-148.
- Shapira, Y., Shohami, E., Sidi, A., Soffer, D., Freeman, S. und Cotev, S. (1988): Experimental closed head injury in rats: Mechanical, pathophysiologic, and neurologic properties. *Crit Care Med*, 16: 258-265.
- Smith, A. L. und Marque, J. J. (1976): Anaesthetics and cerebral edema. *Anaesth*, 45: 64.
- Stephens, G. J., Marriott, D. R. und Djamgoz, M. B. A. (1993): Electrophysiological and biochemical evidence for bradykinin receptors on cultured rat cortical oligodendrocytes. *Neurosci Lett*, 153: 223-226.
- Stewart, J. M., Gera, L., Hanson WL, Zuzack, J. S., Burkard, M., McCullough, R. und Whalley, E. T. (1996): A new generation of bradykinin antagonists. *Immunopharmacol*, 33: 51-60.

- Stover, J. F., Kroppenstedt, S. N., Thomale, U. W., Kempfski, O. S. und Unterberg, A. W. (2000): Isoflurane doubles plasma glutamate and increases posttraumatic brain edema. *Acta Neurochir, Suppl.*, 76: 375-378.
- Stover, J. F., Schöning, B., Beyer, T. F., Woiciechowsky, C. und Unterberg, A. W. (2000): Temporal profile of cerebrospinal fluid glutamate, interleukin-6, and tumor necrosis factor- α in relation to brain edema and contusion following controlled cortical impact injury in rats. *Neurosci Lett*, 288: 25-28.
- Stover, J. F., Schöning, B., Sackowitz, O. W., Woiciechowsky, C. und Unterberg, A. W. (2001): Effects of tacrolimus on hemispheric water content and cerebrospinal fluid levels of glutamate, hypoxanthine, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha following controlled cortical impact injury in rats. *J Neurosurg*, 94: 782-787.
- Stover, J. F. und Unterberg, A. W. (2000): Increased cerebrospinal fluid glutamate and taurine concentrations are associated with traumatic brain edema formation in rats. *Brain Res*, 875: 51-55.
- Stroop, R., Thomale, U. W., Päuser, S., Bernarding, J., Vollmann, W., Wolf, K. J. und Lanksch, W. R. (1998): Magnetic resonance imaging studies with cluster algorithm for characterisation of brain edema after controlled cortical impact injury. *Acta Neurochir, Suppl.*, 71: 303-305.
- Sutton, R. L., Hovda, D. A., Adelson, P. D., Benzel, E. C. und Becker, D. P. (1994): Metabolic changes following cortical contusion: Relationship to edema and morphological changes. *Acta Neurochir, Suppl.*, 60: 446-448.
- Takahashi, H., Manaka, S. und Sano, K. (1981): Changes in extracellular potassium concentration in cortex and brain stem during the acute phase of closed head injury. *J Neurosurg*, 55: 708-717.
- Todd, M. M. und Weeks, J. (1996): Comparative effects of propofol, pentobarbital, and isoflurane on cerebral blood flow and blood volume. *J Neurosurg Anesthesiol*, 8: 296-303.
- Todd, N. V. und Graham, D. I. (1990): Blood-brain barrier damage in traumatic brain contusions. *Acta Neurochir, Suppl.*, 51: 296-299.
- Uhl, E., Wrba, E., Nehring, V., Chang, R. C., Baethmann, A. und Reulen, H. J. (1999): Technical note: a new model for quantitative analysis of brain oedema resolution into the ventricles and the subarachnoid space. *Acta Neurochir*, 141: 89-92.

- Unterberg, A. W. und Baethmann, A (1992): Leukotrienes and cerebral edema. *J Neurosurg*, 76: 339-341.
- Unterberg, A. W. und Baethmann, A. (1983): The kallikrein-kinin-system as mediator in vasogenic brain oedema. *Acta Neurochir, Suppl.*, 123-127.
- Unterberg, A. W. und Baethmann, A. (1984): The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema Part1: cerebral exposure to bradykinin and plasma. *J Neurosurg*, 61: 87-96.
- Unterberg, A. W., Dautermann, C., Baethmann, A. und et al (1986): The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema. Part3: Inhibition of the kallikrein-kinin system in traumatic brain swelling. *J Neurosurg*, 64: 269-276.
- Unterberg, A. W., Hack, U. und Baethmann, A. (1985): Blood Flow, metabolism, and function of the brain during cerebral administration of bradykinin. *Adv Neurosurg*, 13: 326-330.
- Unterberg, A. W., Schmidt, W., Dautermann, C. und Baethmann, A. (1990): The effect of various steroid treatment regimens on cold-induced brain swelling. *Acta Neurochir, Suppl.*, 51: 104-106.
- Unterberg, A. W., Stroop, R. und Thomale, U. (1997): Characterisation of brain edema following controlled cortical impact injury in rats. *Acta Neurochir, Suppl.*, 70: 106-108.
- Unterberg, A. W., Wahl, M. und Baethmann, A. (1983): Bradykinin as a mediator in vasogenic brain edema: effects on blood brain barrier function and pial microcirculation. *Adv Neurosurg*, 11: 355-358.
- Unterberg, A. W., Wahl, M. und Baethmann, A. (1984): Effects of bradykinin on permeability and diameter of pial vessels in vivo. *J Cereb.Blood Flow Metab.*, 4: 574-585.
- Unterberg, A. W., Wahl, M., Hammersen, F. und Baethmann, A. (1987): Permeability and vasomotor response of cerebral vessels during exposure to arachidonic acid. *Acta Neuropath (Berl)*, 73: 209-219.
- Van den Brink, W. A., Marmarou, A. und Avezaat, C. J. J. (1990): Brain edema in experimental closed head injury in the rat. *Acta Neurochir, Suppl.*, 51: 261-262.
- Van den Brink, W. A., Santos, B. O., Marmarou, A. und Avezaat, C. J. J. (1994): Quantitative analysis of blood-brain barrier damage in two models of experimental head injury in the rat. *Acta Neurochir, Suppl.*, 60: 456-458.

- Vorbrodt, A. W., Lossinsky, A. S., Wisniewski, H. M., Suzuki, T., Yamaguchi, T., Masaoka, H. und Klatzo, I. (1985): Ultrastructural observations on the transvascular route of protein removal in vasogenic brain edema. *Acta Neuropath*, 66: 265-273.
- Wahl, M., Schilling, L., Unterberg AW und Baethmann, A. (1993): Mediators of Vascular and Parenchymal Mechanisms in Secondary Brain Damage. *Acta Neurochir, Suppl.*, 57: 64-72.
- Wahl, M., Unterberg, A. und Baethmann, A. (1985): Intravital fluorescence microscopy for the study of blood-brain-barrier function. *Int.J Microcirc*, 4: 3-18.
- Wahl, M., Whalley, E. T., Unterberg, A., Schilling, L., Parsons, A. A., Baethmann, A. und Young, A. R. (1996): Vasomotor and permeability effects of bradykinin in the cerebral microcirculation. *Immunopharmacol*, 33: 257-263.
- Walker, K., Perkins, M. und Dray, A. (1995): Kinins and kinin receptors in the nervous system. *Neurochem Int*, 26: 1-16.
- Wolfe, L. S., Pappius, H. M. und Marion, J. (1976): The biosynthesis of prostaglandins by brain tissue in vitro. *Adv Prostaglandin and Thromboxane Res*, 1: 345-355.
- Wrba, E., Nehring, V., Baethmann, A., Reulen, H. J. und Uhl, E. (1998): Resolution of experimental vasogenic brain edema at different intracranial pressures. *Acta Neurochir, Suppl.*, 71: 313-315.
- Zweckenberger, K., Stoffel, M., Baethmann, A. und Plesnila, N. (2003): Effect of decompression craniotomy on increase of contusion volume and functional outcome after controlled cortical impact in mice. *J Neurotrauma*, 20:1307-1314.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Andreas Unterberg für die konstruktive Beratung bei der Themenfindung und die effektive Koordination der einzelnen Institutionen. Mehr als einmal war er in strittigen Punkten und schwierigen Phasen ein objektiver Schlichter und unermüdlicher Ratgeber. Seine zahlreichen Anregungen flossen direkt in die Forschungsarbeit ein und sorgten für Verbesserungen und Ergänzungen.

Herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. med. John F. Stover bedanken, der die Arbeit mit fruchtbaren Diskussionen, hilfreichen Erklärungen und Hinweisen vorangetrieben hat. Sein Engagement weckte bei mir die Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten. Durch die kollegiale Hilfestellung, Anleitung und die vielen Stunden, die er in die Korrektur investierte, hat er am vorliegenden Ergebnis weitreichenden Anteil. Dafür gebührt ihm großer Dank.

Danken möchte ich auch Herrn Stroop, aus der Arbeitsgruppe für experimentelle Neurochirurgie von Herrn Prof. Unterberg, der mir die physikalischen Grundlagen der Magnetresonanztomographie nahebrachte.

Gedankt sei auch Herrn Professor Dr. med. Wolf, der Abteilung für radiologische Diagnostik des Universitätsklinikums Benjamin Franklin sowie seinen Mitarbeitern, insbesondere Herrn Dr. Dr. med. Bernarding (Bereich experimentelle Kernspintomographie), für die großzügige Bereitstellung ihrer Einrichtungen.

Ariane Dietrich möchte ich für die Anregungen bezüglich des Layouts und für das Redigieren des Textes danken.

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich, daß diese Dissertation von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, 05.04.2004,